

***Paweł Drożdżał***

**Badania strukturalne kompleksów Z-DNA oraz hybrydy  
RNA:DNA z kationami organicznymi i nieorganicznymi**

**Structural studies of Z-DNA complexes and RNA:DNA hybrid  
with organic and inorganic cations**



***Promotor: Prof. dr hab. Lechosław Łomozik***

*Praca przedłożona Radzie Naukowej Wydziału Chemii  
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
celem uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych*

**Poznań 2013**



*Składam serdeczne podziękowania*

**Panu Prof. Lechosławowi Łomozikowi**

Za wskazanie tematu rozprawy, wartościowe rady, pomoc w realizacji  
pracy i prawdziwą ojcowską opiekę w czasie całej współpracy.

**Panu Prof. Mariuszowi Jaskólskiemu**

Za wprowadzenie w fascynujący świat biokrystalografii,  
nieocenioną pomoc i rady w analizie oraz dyskusji eksperymentów.

**Panu Prof. Ryszardowi Kierzkowi**

Za życzliwość i wszechstroną  
pomoc w czasie całej współpracy.



*Serdecznie dziękuję*

Wszystkim osobom, z którymi współpracowałem,  
w szczególności:

**Dr Mirosławowi Gilskiemu**

*Jakubowi Barciszewskiemu*

Dr Karolinie Michalskiej

Dr hab. Annie Gąsowskiej

Dr Szymonowi Krzywdzie

za okazaną pomoc i życzliwość



*Wraz z serdecznymi podziękowaniami  
za wsparcie i pomoc  
pracę dydykuję*

Rodzicom i Rodzeństwu

*Dziękuję także bliskim mi osobom.*





## Abstract

Due to the polyanionic nature of nucleic acids, RNA and DNA molecules are always associated in living cells with organic cations, e.g. biogenic amines and metal cations. These ions decide the stability and functions of nucleic acids. Hence, to understand the role of nucleic acids on the molecular level, studies were carried out on the nature of nucleic acid–cation<sup>n+</sup> interactions. For many years experiments with the use of X-rays (mainly high-resolution data) have been an efficient tool for providing accurate information on the structure of complexes formed by nucleic acids with metal cations and polyamines. However, the number of literature reports on systems of this type remains limited. This is why the aim of the present study was the solution of structures of obtained single crystals of Z-DNA–cation<sup>n+</sup> complexes, analysis of the conformational stability of Z-DNA in the studied complexes, determination and analysis of centers for binding metal cations and biogenic amines with Z-DNA, as well as characterization of the structure of RNA:DNA hybrid with the polypurine tract sequence (PPT) of HIV-1 virus and its interaction in cation-containing systems.

Crystallographic studies of complexes of nucleic acids with organic and inorganic cations were performed. The data obtained as a result of the studies correspond to reverse transcription processes in retroviruses and are associated with possibilities of nucleic acid stabilization in Z-DNA form. Very high-resolution data were recorded and structures were solved of crystals of d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup>, d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>, d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> and d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Cr<sup>3+</sup> complexes that have not yet been reported in the literature. A direct binding between Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> (1) cations and N7\_G6 atom was observed. Both cations have an octahedral coordination sphere in which the remaining sites are occupied by water molecules. In the case of the Zn<sup>2+</sup>(2) ion it was found that this ion bridges N7\_G10 and N7\_G12<sup>ii</sup> atoms from the symmetrically equivalent Z-DNA helix. The tetrahedral coordination sphere of Zn<sup>2+</sup>(2) also includes a Cl<sup>–</sup> anion and a water molecule. A different scheme, unreported in literature, of spermine<sup>4+</sup> interactions (where it forms hydrogen bonds only with phosphate groups of Z-DNA) was observed for the d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> complex. A comparison of helical parameters and angles in the sugar-phosphate backbone of d(CGCGCG)<sub>2</sub> helices in Z-DNA–cation<sup>n+</sup> complexes was made in order to determine the effect of particular ions on the conformation of nucleic acid in the fragments in which metal cations were localized. With the exception of the complex with Mn<sup>2+</sup>, the nucleic acid chain shows a disorder (alternate conformations) in the remaining structures with Z-DNA. The degree of this disorder is as follows: d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Cr<sup>3+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup>. For the

first time interactions of putrescine<sup>2+</sup> with Z-DNA duplex were described. Put<sup>2+</sup> cation, with a double conformation, effectively forms hydrogen bonds with N7\_G atoms from three different helices of Z-DNA. In the crystal structure of the d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Put<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> complex, a K<sup>+</sup> cation was localized that interacts non-covalently with water molecules and oxygen atoms from two phosphate groups of the Z-DNA. The structure of the d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Cr<sup>3+</sup> complex has been analyzed for the first time. None of the three hydrated Cr<sup>3+</sup> cations appeared to be directly bound to donor atoms of Z-DNA. Type B of molecular packing in the *P*2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> crystal lattice was observed for the complex with Cr<sup>3+</sup> cations, contrary to d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup>, d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup> and d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Put<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup> - containing structures (type A).

The results obtained in the present study of new Z-DNA complexes indicate a high degree of conformational lability for the d(CGCGCG)<sub>2</sub> helix. These changes can be achieved by a modification of the ionic environment (metal cations and polyamines<sup>n+</sup>) around the Z-DNA duplex. In the light of the above information and taking into account the competitive and synergic interactions observed in d(CGCGCG)<sub>2</sub>-cation<sup>n+</sup> systems, the findings presented here make a step towards the evaluation of the role of organic and inorganic cations in promoting and stabilizing Z-DNA formed in the transcription process.

The results concerning the conformation and helical parameters obtained for the RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> complex were compared with the values characterizing two RNA:DNA duplexes with the PPT sequence of the HIV-1 virus, described to date. A comparative analysis has shown differences in sugar pucker, the degree of disorder of the RNA strand, stacking interactions in the a5-g6-a7 region and trajectory of the helix axis between the dodecamer and decamer of RNA:DNA with PPT sequence. On the electron density map of RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> structure three [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup> ions were identified that interacted indirectly (via water molecules) with DNA phosphate groups or RNA bases. Conclusions drawn from the study of the RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> complex clearly show a susceptibility of PPT sequences to conformational changes of the sugar-phosphate backbone. Structural transformations observed in the RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> complex occur in many sites of the RNA chain with PPT sequence, which suggests that they are one of preconditions in the effective synthesis of retroviral DNA by RT/HIV-1. The above conclusions can be of importance in determining the mechanism of the multi-step process of reverse transcription, particularly for the description of RNA strand degradation using RNase H of retroviruses.

<b>I</b>	<b>Wstęp</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Część literaturowa</b>	<b>2</b>
II.1	Kwasy nukleinowe	2
II.1.1	Konformacje kwasów nukleinowych i opisujące je parametry	4
II.1.1.1	Konformacje szkieletu cukrowo–fosforanowego	5
II.1.1.2	Konformacje pierścienia cukrowego	5
II.1.1.3	Konformacje wiązania glikozydowego	8
II.1.1.4	Orientacja wokół wiązania C4' – C5'	9
II.1.1.5	Lokalny układ współrzędnych	10
II.1.1.6	Lokalne parametry między sąsiadującymi parami zasad	11
II.1.1.7	Globalne parametry dla pary zasad względem osi helisy	11
II.1.1.8	Lokalne parametry między parami zasad	12
II.2	A-DNA	13
II.3	A-RNA	16
II.3.1	A'-RNA	17
II.4	Hybrydy RNA:DNA	18
II.4.1	Oddziaływania sekwencji polipurynowej z odwrotną transkryptazą wirusa HIV-1	20
II.5	Z-DNA	22
II.5.1	Biologiczne znaczenie Z-DNA	26
II.5.2	Białka wiążące Z-DNA	26
II.6	Oddziaływania DNA z kationami poliamin i metali	28
II.6.1	Oddziaływania Z-DNA z kationami poliamin i metali	30
II.7	Oddziaływania RNA z kationami poliamin i metali	40

<b>III</b>	<b>Cel pracy</b>	<b>44</b>
<b>IV</b>	<b>Materialy i metody badań</b>	<b>45</b>
IV.1	Odczynniki	45
IV.1.1	Synteza DNA i RNA	45
IV.1.2	Odblokowanie i odcięcie DNA od podłoża CPG	45
IV.1.3	Odblokowanie i odcięcie RNA od podłoża CPG	45
IV.1.3.1	Odblokowanie grupy tert-butyldimetylosililowej w pozycji 2' RNA	45
IV.1.4	Oczyszczanie oligonukleotydów DNA i RNA	46
IV.1.4.1	Kolumnienki z odwróconą fazą C-18 „Sep-Pak”	46
IV.1.4.2	Rozdział na płytkach TLC	46
IV.2	Spektrometria mas i pomiar stężenia oligonukleotydów	46
IV.3	Krystalizacja oligomerów kwasów nukleinowych	46
IV.3.1	Krystalizacja oligomerów $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$	46
IV.3.2	Krystalizacja oligomerów $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$	47
IV.3.3	Nasączenie kryształów $d(CGCGCG)_2$ solami $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ i $\text{Cr}^{3+}$	47
IV.3.4	Krystalizacja kompleksu RNA:DNA- $\text{Mg}^{2+}$	48
IV.4	Dane dyfrakcyjne, rozwiązanie struktur i ich udokładnianie	50
IV.4.1	Kompleksy $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ oraz $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$	50
IV.4.2	Kompleks $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$	55
IV.4.3	Kompleks $d(CGCGCG)_2\text{-Cr}^{3+}$	58
IV.4.4	Kompleks RNA:DNA- $\text{Mg}^{2+}$	61

<b>V</b>	<b>Wyniki i dyskusja</b>	<b>63</b>
V.1	Wyniki badań nad kompleksami $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ oraz $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$	63
V.1.1	Jakość wyników	63
V.1.2	Ogólna struktura i parametry heliakalne	63
V.1.3	Koordynacja kationów metali	71
V.1.4	Oddziaływania kationu sperminy <sup>4+</sup> z dupleksem $d(\text{CGCGCG})_2$	74
V.1.5	Hydratacja	77
V.1.6	Upakowanie w sieci krystalicznej	80
V.1.7	Dyskusja wyników dla kompleksów $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ oraz $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$	80
V.2	Wyniki badań nad kompleksem $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$	85
V.2.1	Jakość wyników	85
V.2.2	Ogólna struktura i parametry helikalne	85
V.2.3	Oddziaływania kationu putrescyny <sup>2+</sup> z dupleksem $d(\text{CGCGCG})_2$	87
V.2.4	Oddziaływania kationu $\text{K}^+$ w układzie $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$	88
V.2.5	Hydratacja	91
V.2.6	Dyskusja wyników dla kompleksu $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}$	92
V.3	Wyniki badań nad kompleksem $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$	95
V.3.1	Ogólna struktura i parametry helikalne	95
V.3.2	Koordynacja kationów $\text{Cr}^{3+}$ i upakowanie w sieci krystalicznej	98
V.3.3	Oddziaływania warstwowe	101
V.3.4	Hydratacja	102
V.3.5	Dyskusja wyników dla kompleksu $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$	104

V.4	Wyniki badań nad kompleksem RNA:DNA–Mg <sup>2+</sup>	106
V.4.1	Ogólna struktura i parametry helikalne	106
V.4.2	Nieuporządkowania w łańcuchu RNA	108
V.4.3	Oddziaływania warstwowe	111
V.4.4	Hydratacja i wiązanie kationów Mg <sup>2+</sup>	113
V.4.5	Upakowanie w sieci krystalicznej	117
V.4.6	Dyskusja wyników dla kompleksu RNA:DNA–Mg <sup>2+</sup>	119
<b>VI</b>	<b>Podsumowanie i wnioski</b>	<b>121</b>
<b>VII</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>127</b>

## Wykaz skrótów (w kolejności alfabetycznej)

ADAR	deaminaza adenozyiny dwuniciowego RNA
CPG	podłoże stałe
CSD	strukturalna baza danych Cambridge
DNA	kwasek deoksyrybonukleinowy
HIV	ludzki wirus niedoboru odporności
MPD	(+/-) 2-metylo-2,4-pentanodiol
NDB	bank danych kwasów nukleinowych
NMR	magnetyczny rezonans jądrowy
RNA	kwasek rybonukleinowy
PDB	bank danych białkowych
PPT	sekwencja polipurynowa
r.m.s.d.	średnie kwadratowe odchylenie
RNaza H	rybonukleaza H
RT	odwrotna transkryptaza

### Oznaczenia i definicje kątów torsyjnych dla łańcuchów dinukleotydowych

$\alpha$	O3'(i-1)-P-O5'-C5'
$\beta$	P-O5'-C5'-C4'
$\gamma$	O5'-C5'-C4'-C3'
$\delta$	C5'-C4'-C3'-O3'
$\epsilon$	C4'-C3'-O3'-P(i+1)
$\zeta$	C3'-O3'-P(i+1)-O5'(i+1)
$\chi$	O4'-C1'-N1-C2 (pirymidyny), O4'-C1'-N9-C4 (puryny)





# I Wstęp

Polianionowy charakter cząsteczek DNA i RNA powoduje, że substancje te w komórkach żywych są zawsze zasocjowane z kationami organicznymi np. z amin biogennych i z kationami metali. Jony te decydują o stabilności i funkcjach kwasów nukleinowych. Stąd też dla zrozumienia roli kwasów nukleinowych na poziomie molekularnym należy szczegółowo poznać naturę oddziaływań kwas nukleinowy–kationy<sup>n+</sup>. Stymuluje to rozwój badań biochemicznych, a szczególnie próby poznania struktury kompleksów w powyższych układach. Budowa kompleksów i preferencje poszczególnych polikationów w oddziaływaniach z cząsteczkami kwasów nukleinowych nie są ciągle w pełni zrozumiane (Hud, 2009; Sigel *i in.*, 2011; Sigel *i in.*, 2012).

Wieloletnie prace pokazały, że tak proste pod względem budowy chemicznej cząsteczki jak poliaminy<sup>n+</sup>, w szczególności putrescyna<sup>2+</sup>, spermidyna<sup>3+</sup> i spermina<sup>4+</sup>, mają ważne znaczenie dla DNA i RNA w czasie pełnienia przez nie funkcji biologicznych. Wprowadzenie polikationów do układów biologicznych, prowadzi do zmian w ustalonym schemacie oddziaływań. Dlatego też, istotnym i ciekawym problemem, w aspekcie procesów zachodzących w organizmach żywych, są badania konkurencyjnych i synergicznych oddziaływań w układach kwas nukleinowy–poliamina<sup>n+</sup>–metal<sup>m+</sup>

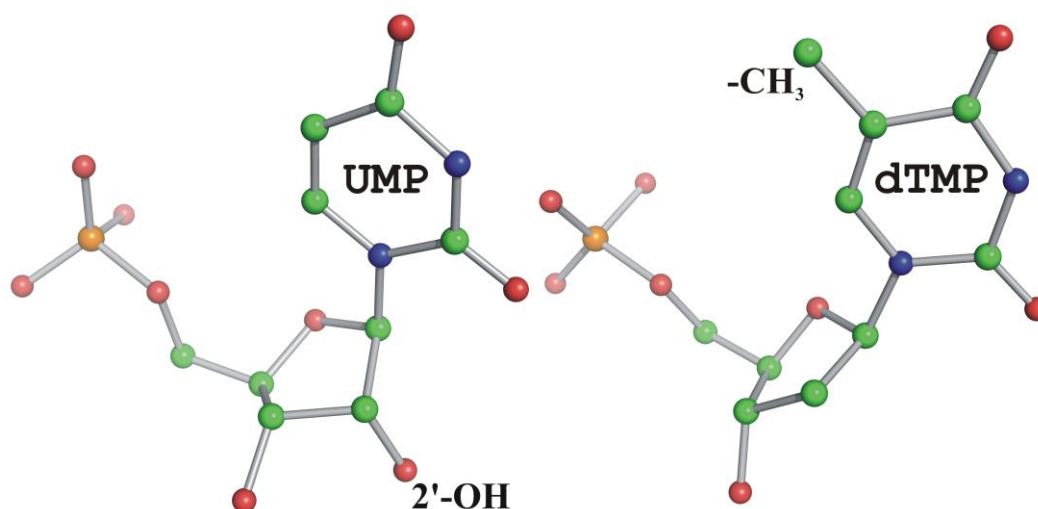
Pomimo, że z punktu widzenia fizjologii najbardziej istotnymi kationami są Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oraz poliaminy biogenne, to badania układów z pozostałymi jonami są uzasadnione w celu wyjaśnienia roli innych kationów w procesach biochemicznych. Ponadto, wyniki badań nad oddziaływaniami kwas nukleinowy–kationy<sup>n+</sup> stają się istotne w przypadku wykorzystania kompleksów metali przejściowych w chemioterapii oraz jako sond molekularnych (Hud, 2009).

Badania z zastosowaniem promieniowania X (głównie dane wysokorozdzielcze) od lat są skutecznym narzędziem w dostarczaniu informacji o strukturze kompleksów kwasów nukleinowych z kationami metali i poliamin. Wciąż jednak dysponujemy stosunkową niewielką liczbą doniesień literaturowych dotyczących tego typu układów.

## II Część literaturowa

### II.1 Kwasy nukleinowe

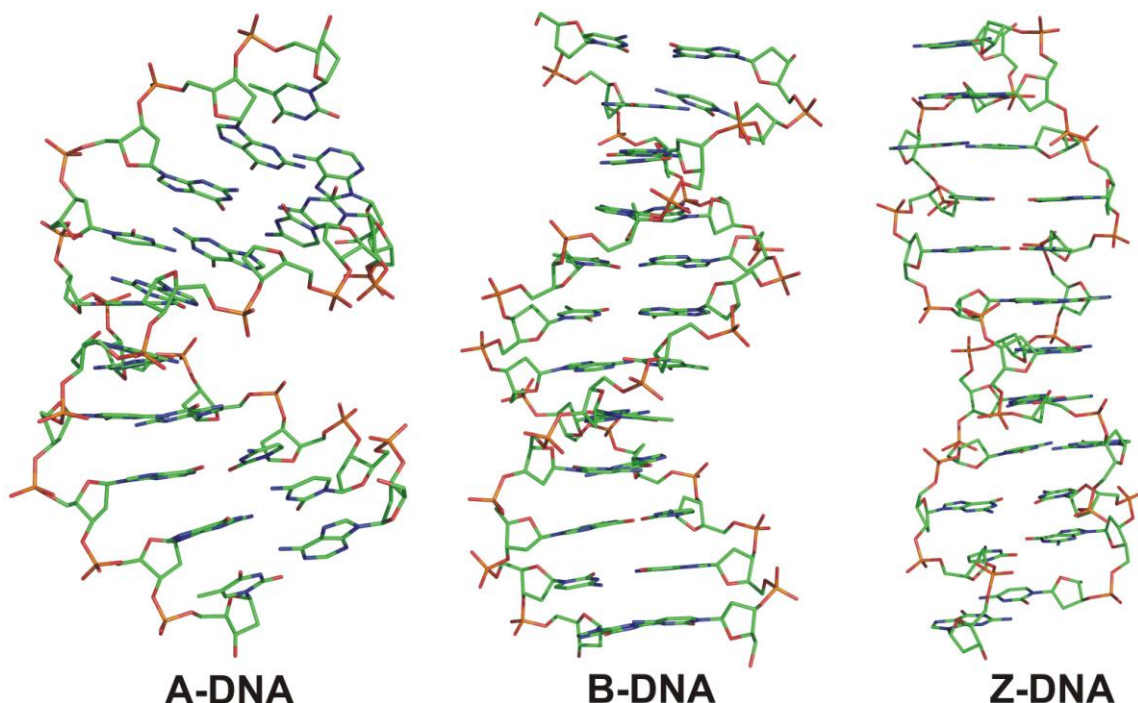
Kwasy nukleinowe to polimery deoksyrybonukleotydów (DNA; ang. *deoxyribonucleic acid*) lub/i rybonukleotydów (RNA; ang. *ribonucleic acid*). Nukleotydy te zbudowane są z zasad azotowych, cukru: deoksyrybozy (w DNA) lub rybozy (w RNA), i reszty kwasu fosforowego. Adenina (Ade), guanina (Gua), cytozyna (Cyt), tymina (Thy) i uracyl (Ura) to nazwy aromatycznych zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych. Budowa nukleotydów RNA różni się od nukleotydów DNA obecnością grupy  $-OH$  w pozycji 2' pierścienia furanozowego, a sekwencje RNA zawierają uracyl (Ura) zamiast tyminy (Thy) obecnej w DNA (Rys. 1).



**Rys. 1.** Podstawowe różnice pomiędzy nukleotydami DNA i RNA na przykładzie kwasu rybourydylowego (UMP; urydyno-5'-monofosforan) i deoksytymidylowego (dTMP; 2'-deoksytymidyno-5'-monofosforan).

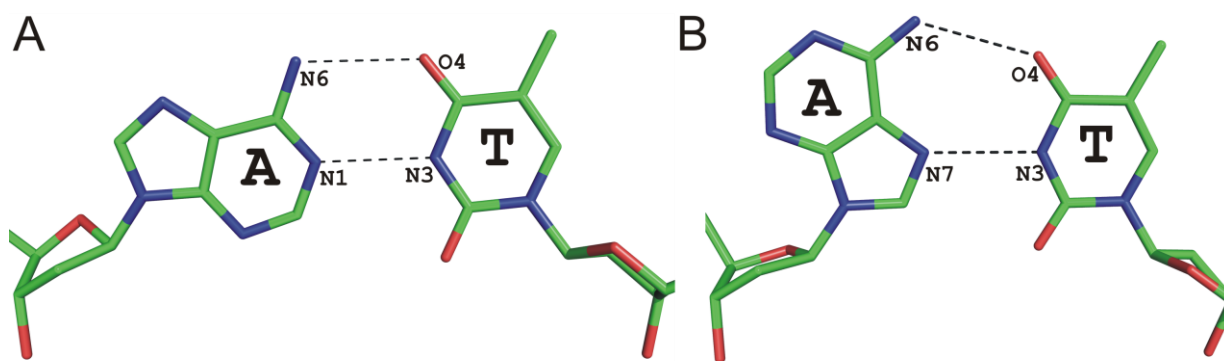
Poza najpowszechniej spotykanymi zasadami w DNA i RNA, w genomach stwierdzono także obecność innych, modyfikowanych pochodnych puryn i pirymidyn, co w szczególności dotyczy RNA (Carell *i in.*, 2012). Zasadniczą formą organizacji strukturalnej DNA, a także RNA, jest podwójna helisa. Jej stabilność uwarunkowana jest wiązaniami wodorowymi między zasadami z obu antyrównoległych nici ( $5' \rightarrow 3'$  i  $3' \rightarrow 5'$ ) oraz oddziaływaniami warstwowymi (ang. *stacking interaction*). Przyjmuje się, że w warunkach fizjologicznych prawoskrętna forma B-DNA (model podwójnej helisy wg Watsona–Cricka; Watson & Crick, 1953) jest dominująca w komórkach (Richmond & Davey, 2003) (Rys. 2 i 3A, Tabela 3). W latach 70. XX wieku odkryto *in vitro*

lewoskrętną formę helisy DNA, nazwaną Z-DNA, której istnienie *in vivo* sugeruje wiele badań biochemicznych (rozdziały II.5.1-2). Tworzenie się lewoskrętnej helisy Z-RNA potwierdziły eksperymenty prowadzone *in vitro* (Zarling *i in.*, 1987). Badania wskazują, że struktury kwasu deoksyrybonukleinowego inne niż B- lub A-DNA mają istotne (wciąż odkrywane) znaczenie w procesach biochemicznych (Chou *i in.*, 2003; Choi & Majima, 2011). Pomimo występowania wielu motywów strukturalnych RNA, połowę z nich stanowią dwuniciowe fragmenty prawoskrętniej helisy (rozdział II.3).



**Rys. 2.** Podstawowe formy dwuniciowej helisy DNA z parowaniem Watsona–Cricka. Źródło: PDB (ang. *Protein Data Bank*) i NDB (ang. *Nucleic Acid Database*; Narayanan *i in.*, 2013).

Innym modelem oddziaływania zasad we fragmentach helikalnych jest parowanie typu Hoogsteena obserwowane głównie dla cząsteczek RNA (Hoogsteen, 1959; Hoogsteen, 1963) (tRNA; kod PDB: 1ehz, Rys. 3B), H-DNA [trójniciowe DNA (Rhee *i in.*, 1999; Bukowiecka-Matusiak & Woźniak, 2006)], G-DNA (kwadrupleksy), ale także dla sekwencji d(ATA<sup>Br</sup>UAT)<sub>2</sub>. W literaturze oraz na serwerze: <http://prion.bchs.uh.edu/1/databases.html>, opisano dużą liczbę przykładów parowania zasad innego niż według Watsona–Cricka (Nagaswamy *i in.*, 2000; Leontis *i in.*, 2002).



**Rys. 3.** Parowanie typu Watsona–Cricka (**A**) i Hoogsteena (**B**) dla pary A·T w dupleksach B-DNA. Kody PDB (indywidualny kod przypisany danej strukturze) odpowiednio 1bna i 1gqu.

### II.1.1 Konformacje kwasów nukleinowych i parametry je opisujące

I-rzędowa struktura DNA i RNA dotyczy sekwencji nukleotydów połączonych w łańcuch polinukleotydowy. Dwie pojedyncze nici polinukleotydów połączone wiązaniami wodorowymi, przybierają ściśle określoną strukturę dwuniciowej helisy (struktura drugorzędowa). Budowa trzeciorzędowa kwasów nukleinowych zależy od konformacji jednostek nukleotydowych i wykazuje (szczególnie w przypadku RNA) dużą różnorodność form i motywów strukturalnych. Zmiany konformacyjne w kwasach nukleinowych mogą być wynikiem zróżnicowania pierścienia furanozy, kątów torsyjnych wokół wiązania N-glikozydowego i wokół pojedynczych wiązań szkieletu cukrowego–fosforanowego.

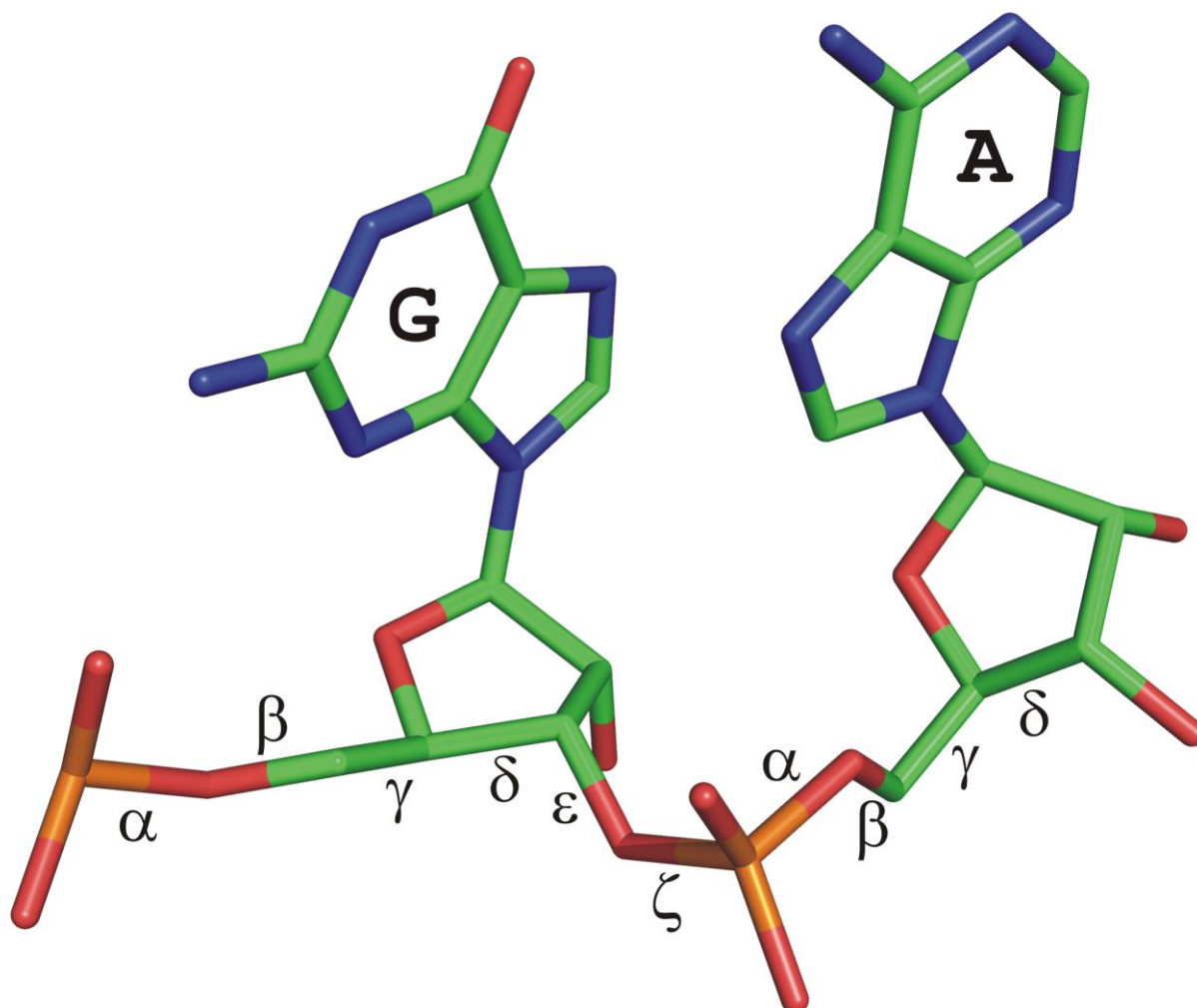
Ze względu na powszechność występowania w strukturach kwasów nukleinowych helikalnych fragmentów konieczna jest także analiza swobody konformacyjnej oraz wzajemnego oddziaływania i zależności między parami zasad z obu komplementarnych nici, a także sąsiadujących zasad w pojedynczym łańcuchu DNA lub RNA. W tym celu zostały opracowane parametry helikalne, które można podzielić na trzy grupy:

- lokalne parametry między parami zasad (ang. *inter – base pair parameters*)
- globalne parametry dla pary zasad względem osi helisy (ang. *global pair – axis parameters*)
- lokalne parametry między zasadami (ang. *base – base parameters*)

Powyższe parametry obliczane są względem lokalnych układów odniesienia wyznaczonych dla każdej pary nukleotydów lub względem osi helisy. W 1998 roku została wprowadzona konwencja normalizująca parametry helikalne zatwierdzona następnie przez IUPAC (ang. *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (Dickerson, 1989a; Dickerson, 1989b). Zapoznanie się z opisem geometrii kwasów nukleinowych jest kluczowym zadaniem dla zrozumienia reguł rządzących oddziaływaniami i właściwościami tych biopolimerów.

### II.1.1.1 Konformacje szkieletu cukrowo–fosforanowego

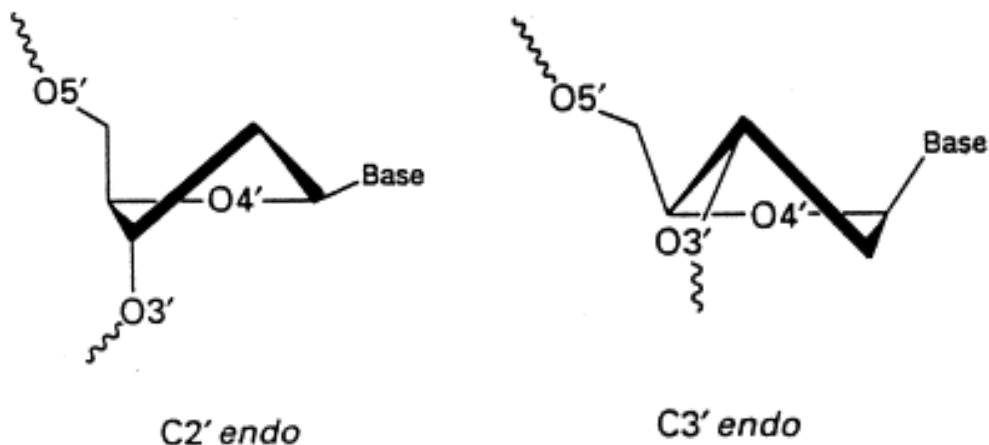
Rotacja wokół pojedynczych wiązań w łańcuchu cukrowo–fosforanowym charakteryzowana jest przez sześć kątów torsyjnych ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ), używanych do opisu geometrii łańcucha polinukleotydowego (Rys. 4).



**Rys. 4.** Kąty torsyjne dla łańcucha cukrowo–fosforanowego. PDB 2r20.

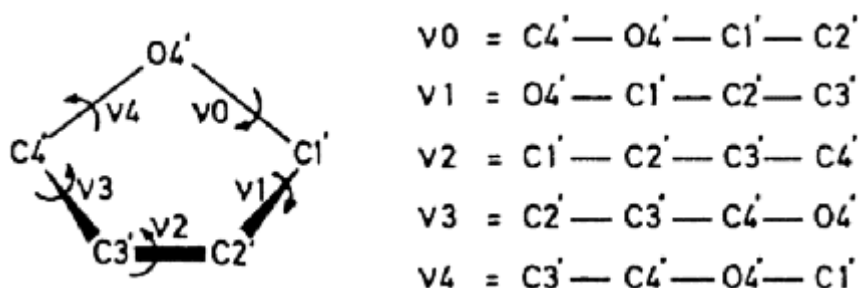
### II.1.1.2 Konformacje pierścienia cukrowego

Pięcioczłonowy pierścień furanozy jest nieplanarny (ang. *puckering*) i przyjmuje konformację półkrzesła (konformacja skręcona T, ang. *twist*) lub koperty (E, ang. *envelope*). W przypadku, gdy tylko jeden atom jest wychylony w stosunku do płaszczyzny pierścienia mówimy o konformacji typu E. W sytuacji, kiedy dwa sąsiednie atomy pierścienia wychylone są w przeciwnych kierunkach z płaszczyzny pierścienia mamy konformację T. Pozycję atomów wychylonych z płaszczyzny pierścienia i leżących po tej samej stronie co atom C5' nazywamy *endo* (Rys. 5). W przypadku przeciwnej pozycji atomów mówimy o konformacji *exo*.



**Rys. 5.** Dwie najbardziej preferowane konformacje pierścienia cukrowego w strukturach kwasów nukleinowych: C2'-endo i C3'-endo.

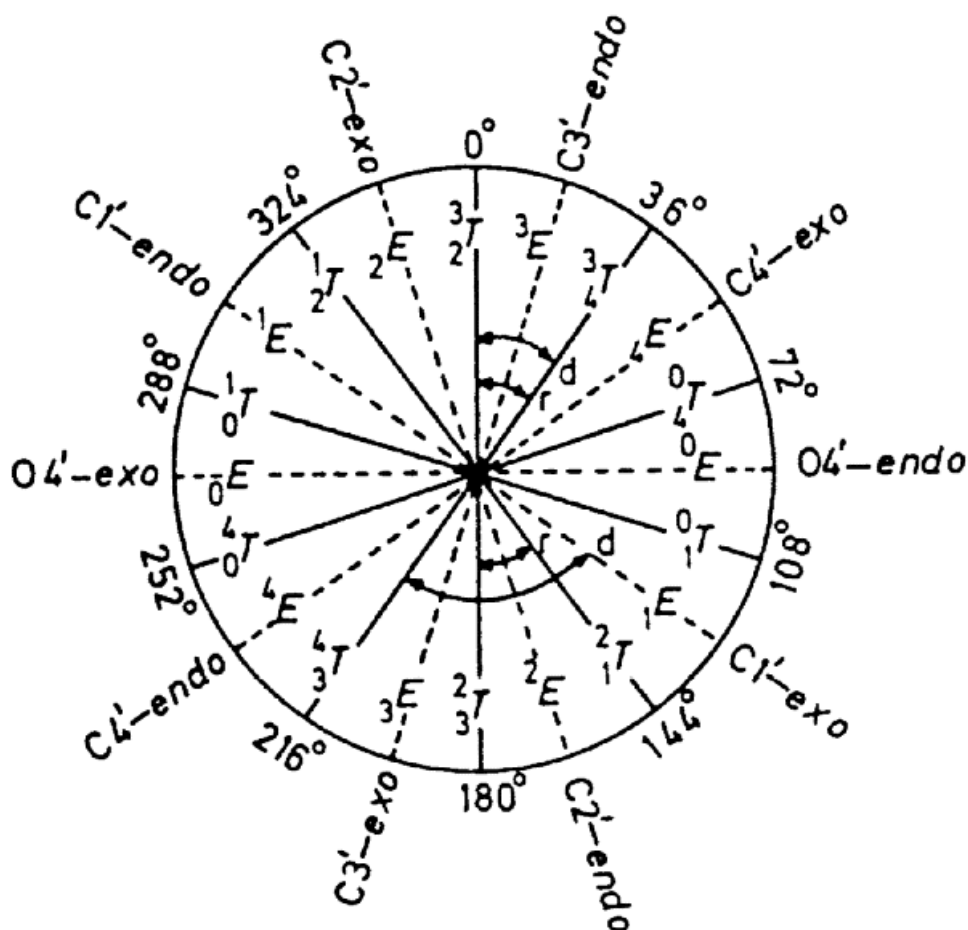
(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc2.html>)



**Rys. 6.** Endocykliczne kąty torsyjne pierścienia furanozowego.

(<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc2.html>)

Precyzyjny opis konformacji pierścienia cukru może być określony przez pięć endocyklicznych kątów torsyjnych (Rys. 6). Każdy spośród pięciu atomów pierścienia może przyjmować pozycję *endo* lub *exo*, co daje po 10 możliwych konformacji typu E oraz T. Pofałdowanie pięcioczłonowego pierścienia (systematyczne zmiany wartości jego kątów torsyjnych) może płynnie zmieniać się od atomu do atomu bez nakładu energii. To kontinuum zmian geometrii pierścienia cukru (zjawisko pseudorotacji) może być uszeregowane według wartości kąta fazowego pseudorotacji ( $P$ ) i maksymalnej amplitudy pofałdowania pierścienia cukru ( $\tau_m$ ) (Altona & Sundaralingam, 1972, Rys. 7).



**Rys. 7.** Koło pseudorotacji z zaznaczonymi wartościami kąta pseudorotacji  $P$  i odpowiadającymi im konformacjami pierścienia cukrowego. (Altona & Sundaralingam, 1972, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/pnuc2.html>)

Kąt pseudorotacji przyjmuje wartości od  $0^\circ$  do  $360^\circ$ . Wartość  $P$  (wzór 1) wskazuje na typ konformacji cukru i jest zdefiniowany pod względem pięciu kątów torsyjnych pierścienia  $v_0 - v_4$ :

$$\operatorname{tg} P = [(v_4 + v_1) - (v_3 + v_0)] / 2 \cdot v_2 \cdot [\sin 36^\circ + \sin 72^\circ] \quad (1)$$

Wartość  $\tau_m$  (wzór 2) opisuje stopień pofałdowania pierścienia cukru i dla większości znanych struktur kwasów nukleinowych zawiera się w zakresie od  $\sim 30^\circ$  do  $\sim 50^\circ$ .

$$\tau_m = v_2 / \cos P \quad (2)$$

Wielkości  $P$  pięciu endocyklicznych kątów są powiązane ze sobą wzorem:

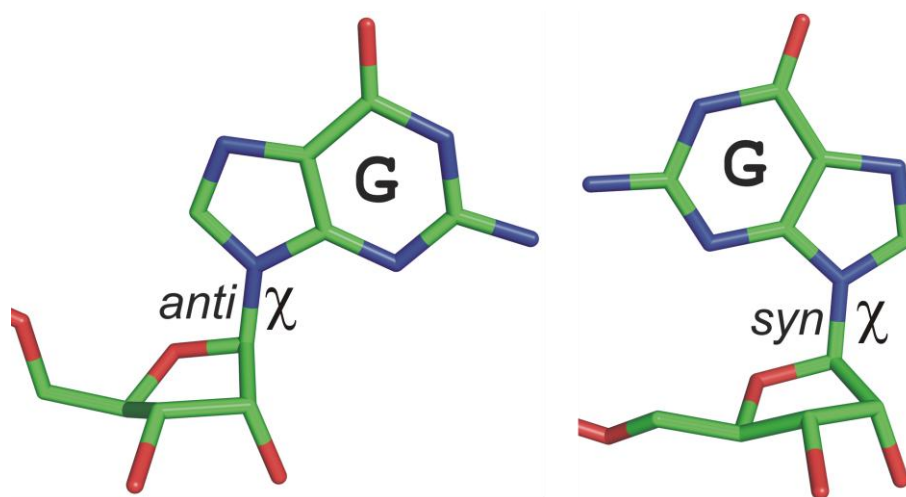
$$v_0 = \tau_m \cdot \cos[P + 0.8 \cdot \pi \cdot (j-2)] \quad (3)$$

Analiza struktury nukleotydów wykazała dwa preferowane przedziały kąta pseudorotacji:  $C3'$ -endo dla  $0^\circ \leq P \leq 36^\circ$  („na północy” koła pseudorotacji lub typu N) i  $C2'$ -endo dla  $144^\circ \leq P \leq 180^\circ$  („na południu” koła pseudorotacji lub typu S).



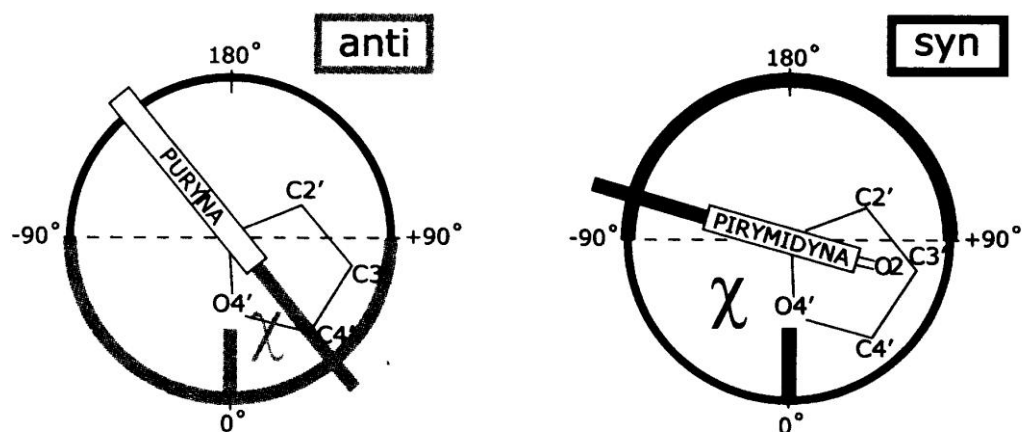
### II.1.1.3 Konformacje wiązania glikozydowego

Dane eksperymentalne wskazują na istnienie dwóch ustawień (*syn* i *anti*) aromatycznej zasady względem reszty cukrowej (Rys. 8 i 9). Kąt torsyjny wiązania N-glikozydowego  $\chi$ , pomiędzy zasadą, a resztą cukrową zdefiniowany jest następująco dla puryn: O4'–C1'–N9–C4 i pirymidyn: O4'–C1'–N1–C2. Dla konformacji *anti* atomy C8 (puryny) i C6 (pirymidyny) znajdują się nad pierścieniem rybozy lub deoksyrybozy powodując tym samym, że grupy atomów zaangażowanych w tworzenie wiązań wodorowych położone są z dala od pierścienia cukru. Konformacja *anti* jest preferowana dla nukleotydów pirymidynowych, ze względu na niekorzystne steryczne kontakty pomiędzy atomem O2 zasady i grupą fosforanową na końcu 5'.



Rys. 8. Guanozyna w konformacji *anti* i *syn*. PDB 2r20.

Konformacja *syn* występuje wówczas, gdy atom N3 (puryny) lub O2 (pirymidyny) leży nad pierścieniem cukrowym. W przypadku nukleotydów purynowych konformacja *syn* może być stabilizowana przez wiązanie wodorowe pomiędzy atomami O5'...H-N3.



Rys. 9. Zakresy konformacyjne dla kąta N-glikozydowego  $\chi$  (Jaskólski, 2010).



Sterycznie preferowanymi przedziałami kąta glikozydowego dla dwóch orientacji zasad wobec pierścienia cukru są:

$$anti: -120 > \chi \geq 180^\circ$$

$$syn: 0 < \chi < 90^\circ$$

Kąt torsyjny  $\chi$  jest skorelowany z typem pofałdowania pierścienia cukrowego (C3'-*endo* lub C2'-*endo*) zgodnie z:

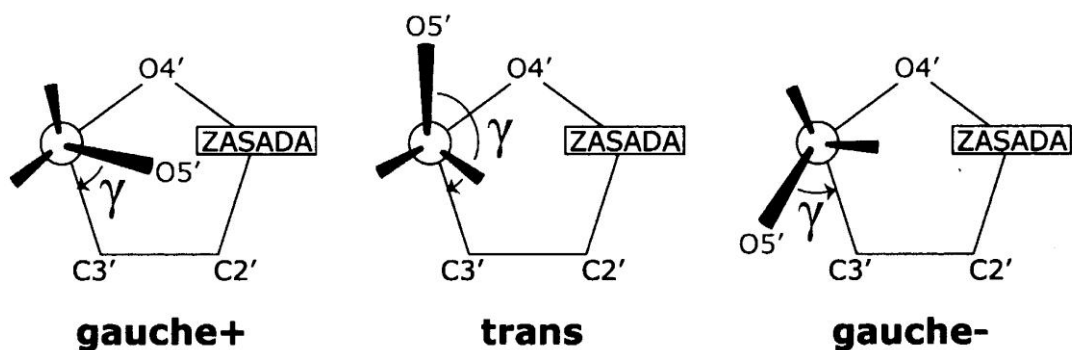
$$-180 \leq \chi \leq -138^\circ \text{ dla C3'-endo}$$

$$-144 \leq \chi \leq -115^\circ \text{ dla C2'-endo}$$

Kąt glikozydowy typu *syn* nie występuje zwykle dla nukleotydów mających pofałdowanie typu C3'-*endo*, ze względu na sterycznie niekorzystne kontakty pomiędzy atomem H3' a zasadą. Wartości kąta  $\chi$  zbliżone do  $90^\circ$  są opisywane jako „wysokie” *anti* (ang. *high anti*).

#### II.1.1.4 Orientacja wokół wiązania C4' - C5'

Na skutek rotacji wokół egzocyklicznego wiązania C4' – C5' atom O5' (ogólnie grupa fosforanowa 5') przyjmuje różne pozycje względem pierścienia furanozy. Możliwe są trzy konformacje w zależności od wartości kąta torsyjnego  $\gamma$  opisującego położenie atomu O5' względem C3' (Tabela 1, Rys. 10).



**Rys. 10.** Zakresy konformacyjne dla kąta torsyjnego  $\gamma$  (Jaskólski, 2010).

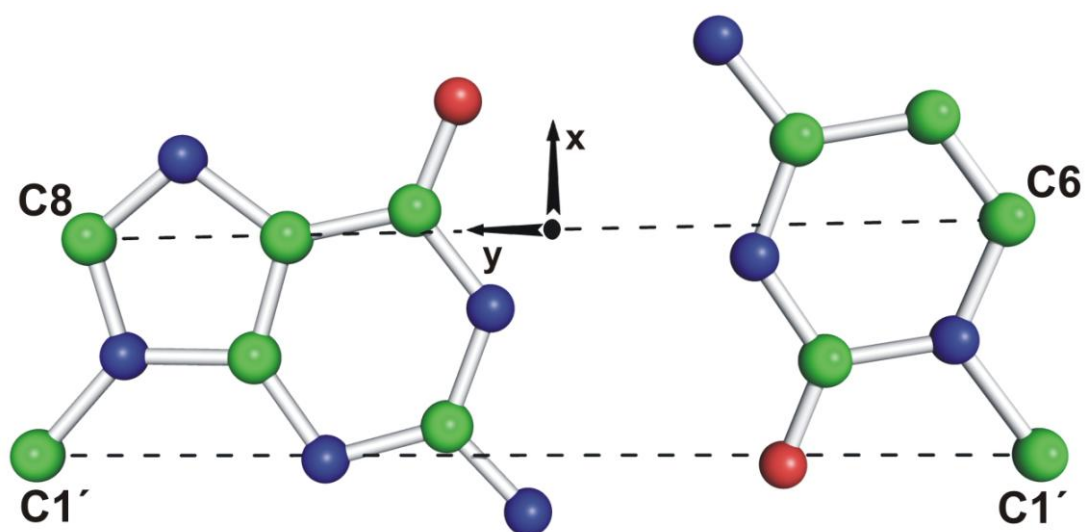
**Tabela 1.** Różne nazewnictwo i wartości dla kąta torsyjnego  $\gamma$  wokół egzocyklicznego wiązania C4' – C5'.

$\gamma$ (°)	Inne oznaczenia
+sc (60°)	gauche(+), g(+), gg
ap (180°)	trans, gt, t
–sc (–60°)	gauche(–), g(–), tg

#### II.1.1.5 Lokalny układ współrzędnych

Metoda obliczeń parametrów helikalnych zakłada, że początek układu odniesienia jest zlokalizowany pośrodku między parą zasad. Takie założenie zostało zarekomendowane na spotkaniu “AIST-NIBHT Structural Biology Center” w Tsukuba, Japonii (Olson *i in.*, 2001) i jest obecnie używane przez większość programów obliczających geometrię kwasów nukleinowych (m.in.: 3DNA; Lu & Olson, 2003).

Początek tego lokalnego układu odniesienia znajduje się w połowie odcinka wyznaczonego przez atomy C6 pirymidyny i C8 puryny. Oś y biegnąca wzdłuż tego odcinka skierowana jest w stronę pierwszej nici kwasu nukleinowego, który zawiera nukleotydy numerowane od 1 do n w kierunku 5' → 3'. Jest ona równoległa do wektora łączącego atomy C1' – C1' (Rys. 11 i 12).



**Rys. 11.** Schemat lokalnego układu współrzędnych (odniesienia) (ang. *coordinate frame*) (Lu & Olson, 2003).

Dla helis mających w swej sekwencji modyfikowane lub nietypowe pary zasad, środek i oś  $y$  lokalnego układu określa się według hipotetycznych atomów C6 i C8. Oś  $x$  leży na uśrednionej płaszczyźnie wyznaczonej przez atomy pierścieni zasad azotowych. Jeżeli mała bruzda podwójnej helisy (dupleksu) zorientowana jest w stronę obserwatora to zwrot osi  $x$  jest prostopadły do płaszczyzny rysunku. Aktualnie dostępnych jest wiele programów i serwerów internetowych pomocnych w analizie struktury kwasów nukleinowych. Są to między innymi: 3DNA, Curves+, a także w3DNA (<http://w3dna.rutgers.edu>), 3DNA Landscapes (<http://3dnascapes.rutgers.edu>), Curves+ Web Server ([http://gbio-pbil.ibcp.fr/cgi/Curves\\_plus](http://gbio-pbil.ibcp.fr/cgi/Curves_plus)) i PROSIT (wizualizacja i analiza konformacji pierścienia cukru; <http://cactus.nci.nih.gov/pseudo-visual/>, <http://cactus.nci.nih.gov/prosit/>).

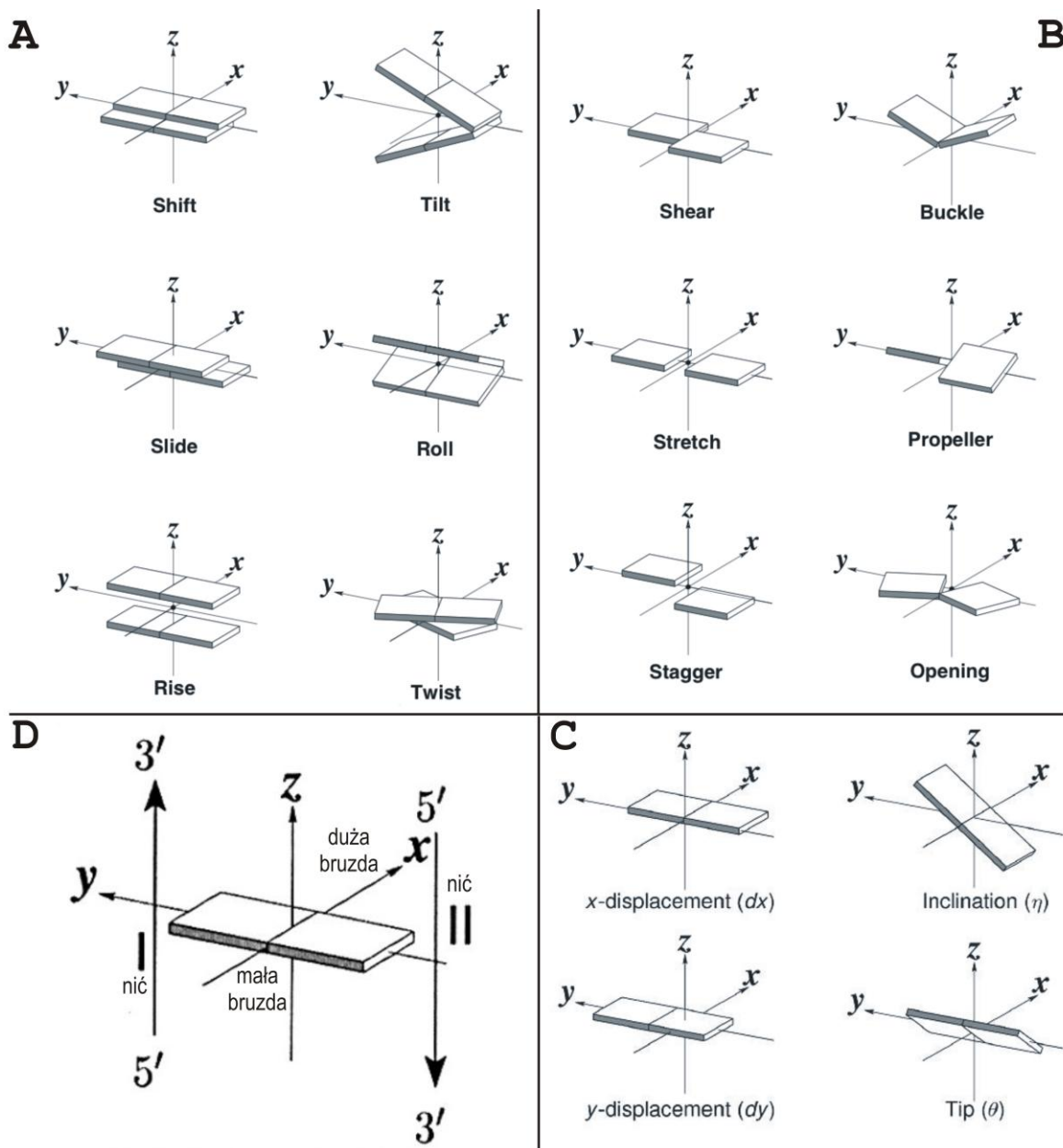
#### II.1.1.6 Lokalne parametry między sąsiadującymi parami zasad

Zgodnie z przyjętymi regułami dodatni znak kąta skrętu (ang. *twist angle*) dotyczy prawoskrętnych dupleksów. W sytuacji, gdy sąsiednie pary zasad są rozwarte w stronę małej bruzdy parametr *roll* (odchylenie płaszczyzn par zasad względem kierunku prostopadłego do wyznaczonych przez wiązania wodorowe) jest dodatni, gdy natomiast to rozwarcie zachodzi w stronę pierwszego łańcucha, dodatni jest parametr *tilt* (odchylenie płaszczyzn wyznaczonych przez pary zasad od płaszczyzny prostopadłej do osi helisy) (Rys. 12A).

Dla B-DNA *tilt* wynosi  $-6^\circ$  (minus oznacza, że zasady odchylają się w kierunku większej bruzdy), a dla formy A jest równy  $20^\circ$ . Odległość między płaszczyznami sąsiednich par zasad opisuje parametr *rise*, który dla B-DNA wynosi 3,4 Å (Bryszewska & Leyko, 2000).

#### II.1.1.7 Globalne parametry dla pary zasad względem osi helisy

Położenie poszczególnych par zasad względem układu odniesienia, związanego z osią główną dupleksu opisują globalne parametry helikalne. Parametry  $\theta$  (ang. *tip*) i  $\eta$  (ang. *inclination*) określają kąty rotacji par zasad względem osi  $x$  i  $y$  układu odniesienia. Odległość par zasad od osi helisy w kierunku  $x$  i  $y$  opisywana jest odpowiednio przez parametry  $dx$  ( $x$ -displacement) i  $dy$  ( $y$ -displacement) (Rys. 12B).



**Rys. 12.** Parametry helikalne wyznaczone przez program 3DNA (Lu & Olson, 2003). Dla wielu nazw parametrów helikalnych brak jest odpowiedników w polskiej literaturze naukowej. **(A)** Lokalne parametry helikalne pomiędzy sąsiadującymi parami zasad. **(B)** Lokalne parametry między sparowanymi zasadami. **(C)** Lokalne parametry helikalne pomiędzy sąsiadującymi parami zasad względem osi helisy. **(D)** Prawoskrętny, ortogonalny układ współrzędnych stosowany w obliczeniach parametrów helikalnych.

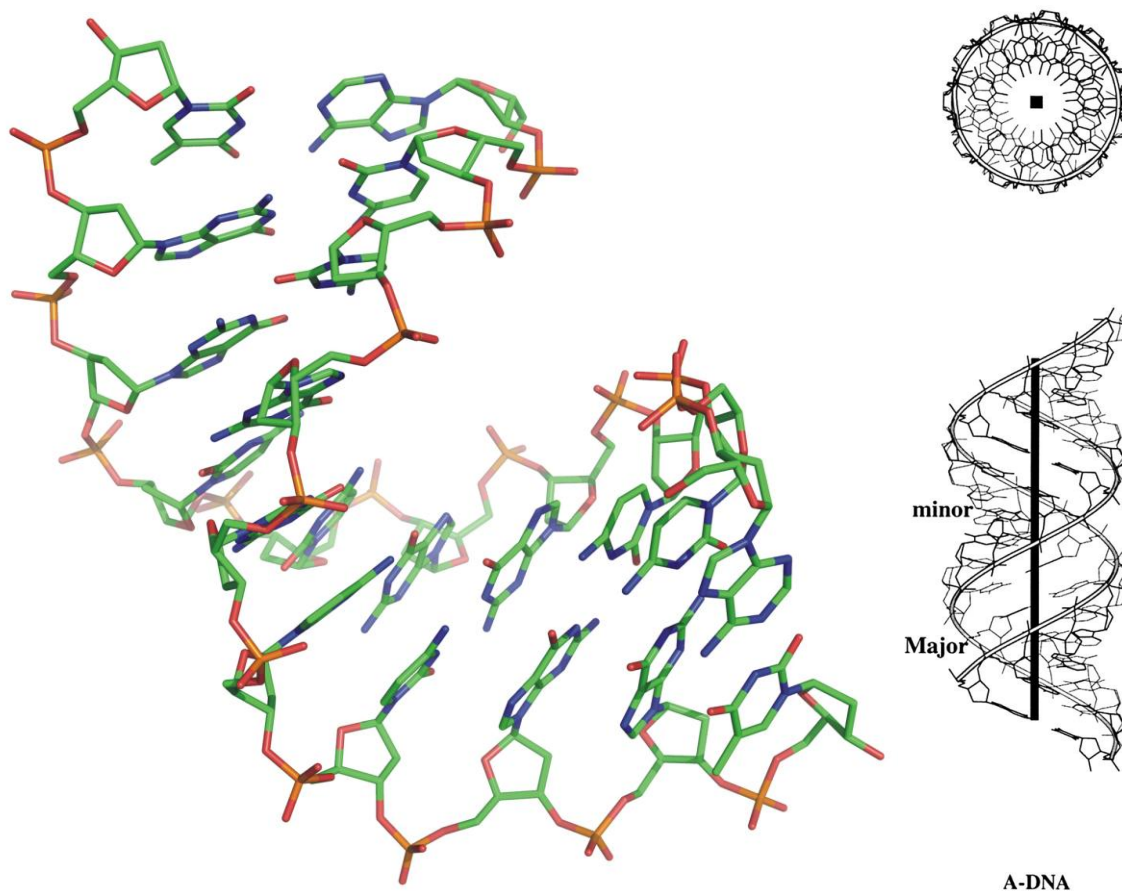
#### II.1.1.8 Lokalne parametry między sparowanymi zasadami

Kąt otwarcia pary (ang. *opening*), skręcenie śmigłowe (ang. *propeller*) opisuje wzajemne skręcenie płaszczyzn zawierających poszczególne zasady. Parametry: *propeller twist* ( $\omega$ ) i *buckle* ( $\kappa$ ) opisują odstępstwo od planarności dwóch sparowanych zasad, odpowiednio, w stosunku do krótkiej i długiej osi (Rys. 12C).

## II.2 A-DNA

Kwas deoksyrybonukleinowy jest cząsteczką dynamiczną mogącą przyjmować różne konformacje (Ghosh & Bansal, 2003). Ten polimorfizm konformacyjny DNA został potwierdzony głównie badaniami z użyciem promieni X. Jednym z podstawowych czynników wywołujących przejścia między formami DNA jest zmiana jego sfery hydratacyjno-jonowej.

Obniżenie liczby cząsteczek wody lub zwiększenie stężenia soli (organicznej lub nieorganicznej) wokół dominującego *in vivo* B-DNA prowadzi do przejścia do prawoskrętnej formy A-DNA (Rys. 13, Tabela 2). Cechą charakterystyczną tej struktury jest odchylenie (ang. *tilting*) płaszczyzny par zasad o  $20^\circ$  od położenia prostopadłego względem osi helisy, oraz konformacja C3'-*endo* (typ N) pierścienia deoksyrybozy. Ze względu na te cechy w formie A-DNA występuje głęboka i wąska duża bruzda oraz bardzo płytka, ale szeroka mała bruzda. Na jeden skok (obrót) helisy A-DNA przypada 11 nukleotydów, a długość jednego skoku wynosi 28 Å. W Tabeli 3 zestawiono charakterystyczne wartości niektórych parametrów helikalnych dla kwasów nukleinowych w formie A, a także dla porównania dla B-DNA.



**Rys. 13.** Struktura helisy A-DNA; PDB 1d13. (Lu & Olson, 2003).

**Tabela 2.** Wybrane struktury A-DNA z bazy PDB.

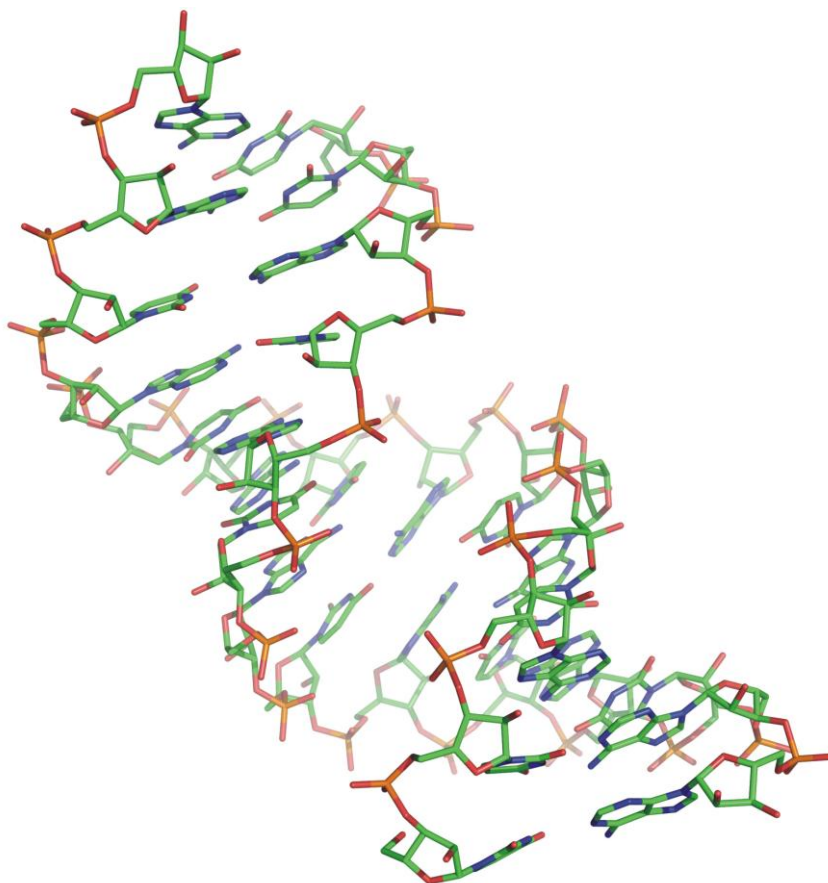
Sekwencja	Kation metalu lub poliaminy	Rozdzielczość (Å)	<i>R</i> (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB
d(CATGGGCCCATG) <sub>2</sub>	-	1,30	19,0	<i>P</i> <sub>4</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub>	1dc0
d(GTGTACAC) <sub>2</sub>	-	1,40	19,8	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>	1d78
d(GGGCGCCC) <sub>2</sub>	-	1,70	16,2	<i>P</i> <sub>4</sub> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub>	2d94
d(CGCCCGCGGGCG) <sub>2</sub>	-	1,90	16,5	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	399d
d(ACGTACGT) <sub>2</sub>	-	1,90	17,7	<i>P</i> <sub>4</sub> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub>	243d
d(GTGTACAC) <sub>2</sub>	spermina <sup>4+</sup>	2,00	11,5	<i>P</i> <sub>4</sub> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub>	1dns
d(GTGTACAC) <sub>2</sub>	-	2,00	12,7	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>	1vtb
d(CCCCCGCGGGGG) <sub>2</sub>	spermina <sup>4+</sup>	2,00	17,7	<i>P</i> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	2d47
d(ACCCGCGGGT) <sub>2</sub>	Ba <sup>2+</sup>	2,00	20,6	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>	220d
d(AGGGGCGGGGCT): d(TAGCCCCGCCCC)	-	2,10	21,2	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	1zje
d(CCGGGCCCCG) <sub>2</sub>	spermina <sup>4+</sup>	2,15	15,3	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub>	321d
d(CCCCCGGG) <sub>2</sub>	-	2,25	13,4	<i>P</i> <sub>4</sub> <sub>3</sub> <sub>2</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub>	187d
d(GCGTACGTACGC) <sub>2</sub>	-	2,55	14,2	<i>P</i> <sub>6</sub> <sub>1</sub> <sub>2</sub> <sub>2</sub>	117d

**Tabela 3.** Parametry helikalne A-DNA, A-RNA i A'-RNA. Dla porównania podano także B-DNA (Saenger, 1984; Arnott, 1999; Svozil *i in.*, 2008).

Parametry strukturalne	A-DNA	A-RNA	A'-RNA	B-DNA
Skok helisy (Å)	28	28	28	36
Liczba nukleotydów na jeden skręt	11	11	12	10,5
Konformacja reszty cukrowej	C3'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C2'-endo
Kąt wokół wiązania N-glikozydowego $\chi$ (°)	200,5	197,0	197,0	250,3
Kąty torsyjne (°)				
$\alpha$	294,8	291,0	290,0	299,0
$\beta$	172,7	179,0	177,0	179,3
$\gamma$	54,3	55,0	61,0	48,4
$\delta$	82,1	82,0	77,0	132,8
$\varepsilon$	205,6	206,0	207,0	181,7
$\zeta$	285,4	289,0	290,0	263,2
Odległość P – P (Å)	5,9	5,9	5,9	7,0
Parametry helikalne				
<i>helical twist</i> $\Omega_h$ (°)	32,5	32,7	30,0	36,0
<i>helical rise</i> (Å)	2,8	2,8	3,0	3,38
<i>inclination</i> $\eta$ (°)	14,7	15,5	10,6	2,8
<i>x-displacement</i> (Å)	–4,8	–4,8	–4,8	0,0
Mała bruzda (Å)				
szerokość	11,1	10,8	10,5	6,0
głębokość	2,6	3,3	3,4	8,2
Duża bruzda (Å)				
szerokość	2,2	4,7	8,9	11,6
głębokość	13,0	12,9	14,4	8,5

### II.3 A-RNA

Jedną z wielu form strukturalnych, jakie przyjmuje w organizmach żywych kwas rybonukleinowy jest podwójna helisa. Helikalne rejony w strukturze RNA mają formę typu A (Rys. 14 i Tabela 4). Różnice w budowie strukturalnej pomiędzy A-RNA a A-DNA przedstawia Tabela 3.



**Rys. 14.** Struktura helisy A-RNA; PDB 1rna.

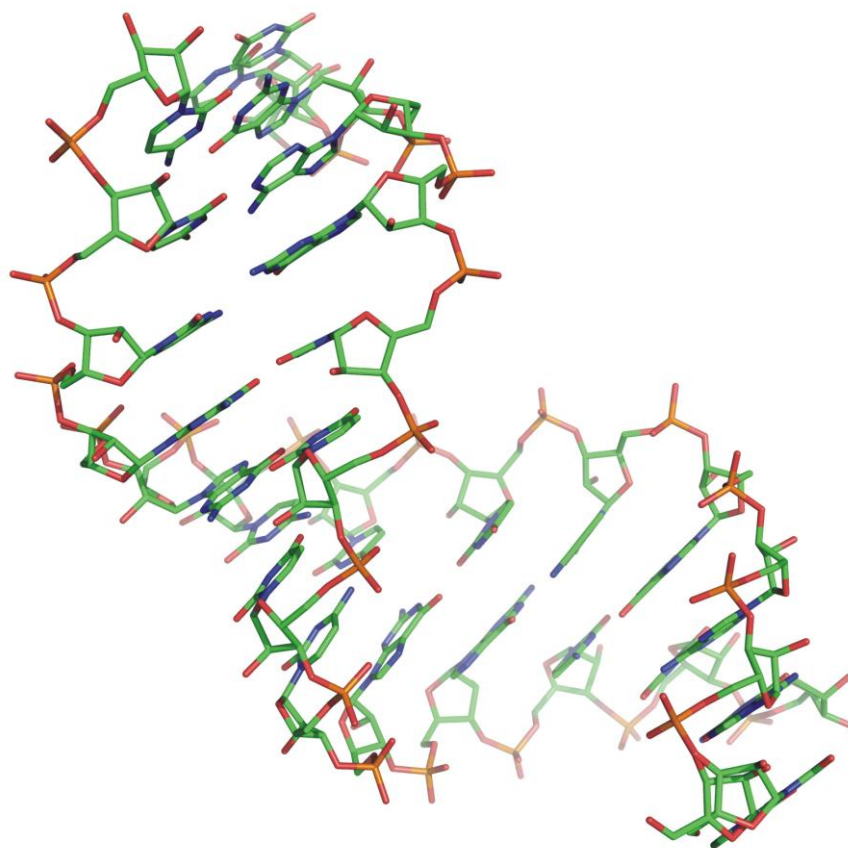


**Tabela 4.** Wybrane struktury A-RNA z bazy PDB.

Sekwencja	Kation metalu	Rozdzielczość (Å)	R (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB
r(GGGGGGGGGGGG):r(CCCCCCCCCCCC)	-	1,20	11,6	P3	1qcu
r(GCGUUUGAAACGC) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> / Mg <sup>2+</sup>	1,40	15,9	P1	2r1s
r(CGCG <sup>F</sup> CG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	1,45	17,2	P1	3jxq
r(CCCCGGGG) <sub>2</sub>	-	1,46	20,1	R32	259d
r(CCGAUGGUAGUG): r(GCGAGAGUAGGC)	Mg <sup>2+</sup>	1,50	20,2	C2	354d
r(GGCGUCGCUAGUACCG): r(GGUACUAAAAGUCGCCC)	Mg <sup>2+</sup>	1,51	20,0	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2oe5
r(AGAGAAGAUCUUCUCU) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> / Mg <sup>2+</sup>	1,52	17,6	R32	3nd4
r(CUGCUGCUGCUGCUGCUG) <sub>2</sub>	-	1,58	22,4	R3	1zev
r(UUAUAUAUAUAUAA) <sub>2</sub>	-	2,25	13,1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1rna
r(UAAGGAGGUGAU) <sub>2</sub>	-	2,60	19,5	P1	1sdr
r(CUUGCUGAAGCGCGCACGGCAAG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> / Mn <sup>2+</sup>	2,60	20,0	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	2oj0

### II.3.1 A'-RNA

Badania krystalograficzne (Tanaka *i in.*, 1999), spektroskopii rezonansu magnetycznego (NMR; ang. *Nuclear Magnetic Resonance*), a także biochemiczne (Bullock *i in.*, 2010) wskazują na możliwość występowania helisy RNA także w formie A' (Rys. 15). Główne różnice pomiędzy A-RNA i A'-RNA dotyczą liczby nukleotydów przypadających na jeden skręt helisy (odpowiednio 11 i 12), a także szerokości dużej bruzdy (4,7 Å i 8,9 Å) (Tabela 3). Tak jak to jest w przypadku innych struktur kwasów nukleinowych, przejście z formy A-RNA do A'-RNA związane jest ze zmianą sfery hydratacyjno-jonowej (pola jonowego). Pomimo, że różnice pomiędzy A-RNA i A'-RNA są stosunkowo niewielkie, to mają one prawdopodobnie istotne znaczenie dla oddziaływań RNA–białko.



**Rys. 15.** Struktura helisy A'-RNA; PDB 413d.

## II.4 Hybrydy RNA:DNA

Hybrydą RNA:DNA nazywamy heliakalną cząsteczkę, w której jedną z nici jest RNA, a drugą komplementarna nić DNA (Tabela 5). Takie hybrydy generalnie przybierają formę A kwasów nukleinowych, jednakże poszczególne parametry helikalne dla molekuly RNA:DNA mogą być mniej lub bardziej zbliżone do któregoś z typów helisy: A-DNA, A-RNA lub A'-RNA. Badania krystalograficzne pokazują, że w hybrydach RNA:DNA zarówno rybo- jak i deoksyrybozy przyjmują konformację C3'-*endo*. Z drugiej strony, pomiary NMR sugerują, że deoksyrybozy w dupleksach RNA:DNA mają konformacje charakterystyczne dla B-DNA (C2'-*endo*, C1'-*exo*, O4'-*endo*), a rybozy dla formy A kwasów nukleinowych. Formowanie się fragmentów dupleksów RNA:DNA odgrywa ważną funkcjonalną rolę w biologii i w warunkach fizjologicznych ma miejsce podczas replikacji DNA (fragmenty Okazaki), transkrypcji i np. syntezy retowirusowego cDNA przez odwrotną transkryptazę (Shown & Arya, 2008). Badania nad oddziaływaniami i strukturą RNA:DNA stanowią ważny etap wyjaśniania procesów transferu informacji genetycznej, podobnie jak dalej omawiane wyniki nad oddziaływaniem kationów metali i poliamin biogennych z kwasami nukleionowymi.

**Tabela 5.** Wybrane struktury hybryd RNA:DNA z bazy PDB.

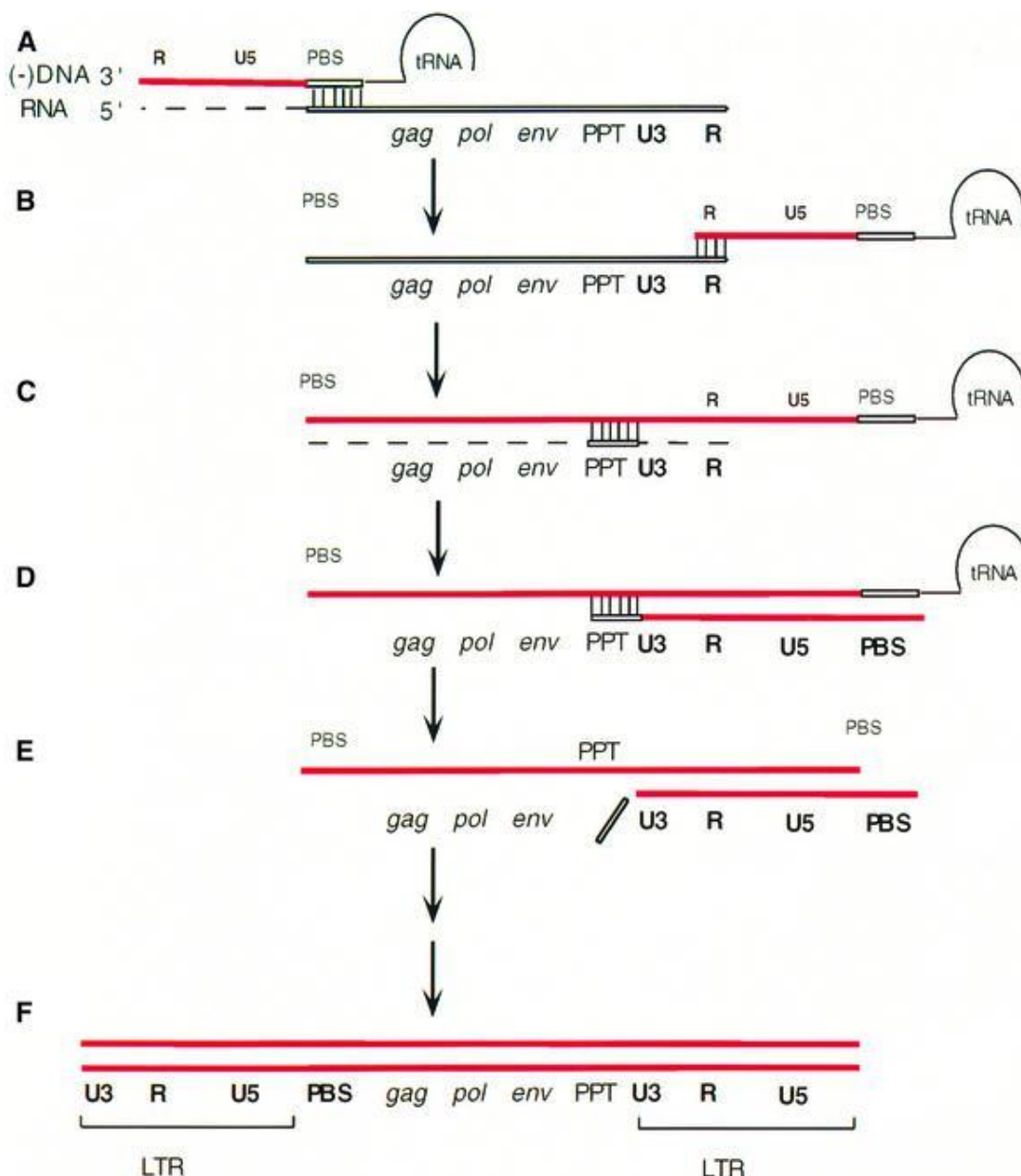
Sekwencja	Kation metalu	Rozdzielczość (Å)	R (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB
r(CAAAGAAAAG):d(CTTTTCTTTG)	Mg <sup>2+</sup> (5x)	1,10	11,7	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1pjo
r(CAAAGAAAAG):d(CTTTTCTTTG)	Ca <sup>2+</sup> (3x)	1,15	14,3	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1g4q
r(CAAAGAAAAG):d(CTTTTCTTTG)	Ca <sup>2+</sup> (4x)	1,15	13,2	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1pjj
r(UAAAAGAAAAGG):d(CCTTTTCTTTA)	Mg <sup>2+</sup> (3x)	1,60	18,1	P3 <sub>2</sub> 21	<b>3ssf</b> <b>ta praca</b>
r(GAAGAAGAA):d(TTCTT <sup>Br</sup> CTTC)	-	1,80	20,1	P6 <sub>1</sub>	421d
r(UUCGGGCGCC):d(GGCGCCCGAA)	-	2,30	14,5	P4 <sub>3</sub> 22	1fix
r(GAAGAGAGAG):d(CTCCTCTTC)	-	2,30	19,9	I222	1efo
r(CAAAGAAAAG):d(CTTTTCTTTG)	-	2,38	22,3	I222	1jb8
r(GAAGAGAAGC):d(GCTTCTCTTC)	-	2,50	18,1	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	404d

W szczególności zasugerowano, że specyfika struktury dupleksów RNA:DNA zawierających sekwencję polipurynową z genomu wirusa HIV-1 (PPT) może mieć znacznie w oddziaływaniach z enzymem odwrotnej transkryptazy tego wirusa (RT; ang. *Reverse Transcriptase*). Postulowano, że konformacja C2'-*endo* w nici RNA, określona szerokość małej bruzdy, a także możliwość przyjmowania różnych konformacji szkieletu cukrowo–fosforanowego przez hybrydy RNA:DNA wpływa na jej oddziaływania z domeną RNazy H odwrotnej transkryptazy wirusa HIV-1. Badania krystalograficzne i NMR dają sprzeczne wyniki, co do szerokości małej bruzdy w hybrydach RNA:DNA z sekwencją PPT. Wyniki pomiarów krystalograficznych wskazują, że helisy RNA:DNA mają typową dla form A szerokość małej bruzdy, natomiast rezultaty badań NMR sugerują, że wartość ta jest pośrednia między A i B (Kopka *i in.*, 2003).

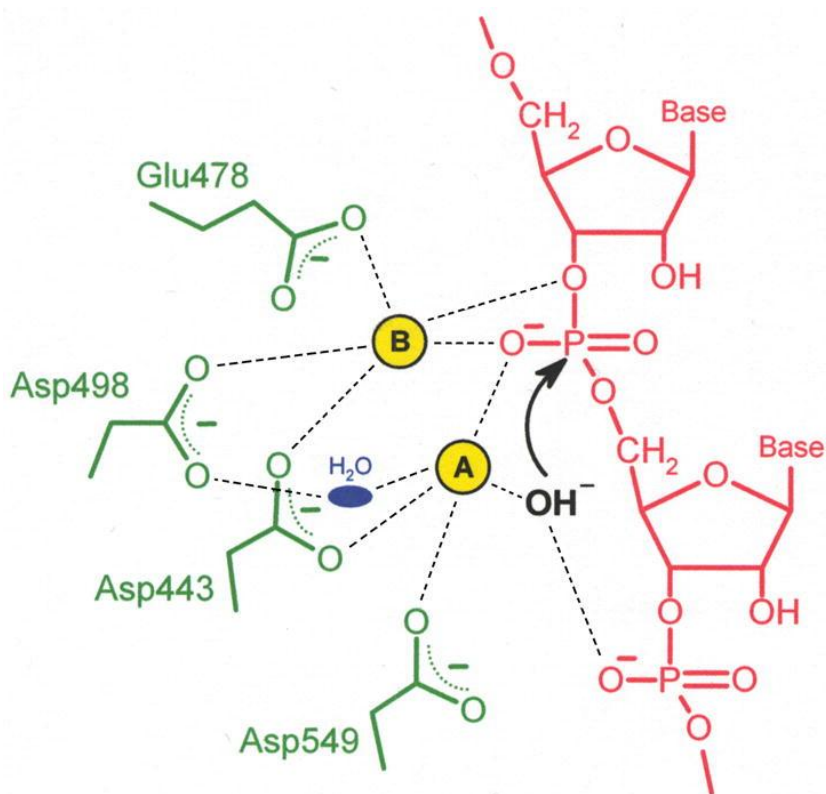
#### II.4.1 Oddziaływania sekwencji polipurynowej z odwrotną transkryptazą wirusa HIV-1

Genom wirusa HIV-1 (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) tak jak w przypadku innych retrowirusów zbudowany jest z dwóch identycznych cząsteczek RNA mających długość około 9800 nukleotydów (Watts *i in.*, 2009). Podstawowym krokiem w replikacji HIV-1 jest przejście od wirusowego ssRNA (ang. *single strand*) do dsDNA (ang. *double strand*) za pośrednictwem enzymu odwrotnej transkryptazy, mającego zarówno aktywność polimerazy jak i rybonukleazy (ang. *RNase H*) (Rys. 16; Sarafianos *i in.*, 2001). Obecny w komórkach gospodarza tRNA (a dokładnie jego grupa 3'-OH) służy jako starter (ang. *primer*) do zainicjowania syntezy nici (-) DNA. Następnie zhybrydowany fragment RNA (sekwencje R i U5) zostaje zhydrolizowany (usunięty) przez domenę RT o aktywności RNazy H. Kompleks tRNA:DNA zostaje przesunięty na koniec 3' matrycy. Po tym etapie następuje dalsze wydłużenie nici (-) DNA. Matryca ssRNA wykorzystana do syntezy nici (-) DNA zostaje usunięta przez RNazę H za wyjątkiem sekwencji polipurynowej (PPT): 5'-aaaagaaaagggggg-3' (ang. *polypurine tract*), która służy jako starter do utworzenia nici (+) DNA. W kolejnym etapie PPT i tRNA zostają usunięte, a odcinek PBS (ang. *primer binding site*) hybryduje z komplementarnym PBS z nici (-) DNA. Proces odwrotnej transkrypcji kontynuowany jest dalej przez domenę RT odpowiedzialną za polimeryzację DNA. W pełni zsyntetyzowane obie nici DNA włączane są do genomu gospodarza w jądrze komórkowym przez enzym integrazę. Sekwencja PPT ma istotne znaczenie podczas procesu odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1. Jego przebieg nie zachodzi typowo, w co najmniej trzech przypadkach. Po pierwsze, jeśli odcinek PPT RNA nie jest odporny na działanie RNazy H w czasie tworzenia nici (-) DNA. Po drugie, gdy niepoprawne usunięcie matrycy RNA przez RNazę H na końcu PPT nie prowadzi do utworzenia właściwego startera do syntezy nici (+) DNA. Po trzecie, kiedy PPT jest niedokładnie usunięty z końca nowo powstającego wirusowego DNA. Domena RT o aktywności RNazy H specyficznie hydrolizuje nić RNA w hybrydach RNA:DNA. Badania biochemiczne z udziałem kationów  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  i  $Co^{2+}$  (Klumpp *i in.*, 2003) wykazały, że RNaza H wirusa HIV-1 wymaga dla swej aktywności dwóch jonów metali. Prawdopodobnie *in vivo* rolę tę spełniają tylko jony  $Mg^{2+}$  (Rys. 17; Champoux & Schultz, 2008; Champoux & Schultz, 2009; Sarafianos *i in.*, 2009). Dwa kationy  $Mn^{2+}$  zlokalizowano w centrum aktywnym RNazy H wirusa HIV-1 w odległości  $\sim 4$  Å od siebie (kod PDB: 1hrh; Davies *i in.*, 1991). Jony te oddziałują z aminokwasami D443, E478, D498, i D549. Wnioski wynikające z analizy struktur krystalograficznych bakteryjnej RNazy H z *B. halodurans* (Nowotny *i in.*, 2005) i ludzkiej (Nowotny *i in.*, 2007) z hybrydą RNA:DNA informują nas o roli kationów dwuwartościowych w katalitycznym mechanizmie strukturalnie

podobnej domeny RNazy H wirusa HIV-1 i M-MLV (ang. *Moloney Murine Leukemia Virus*) (Nowotny & Yang, 2006). W tym mechanizmie, jeden z jonów, metal A, aktywuje nukleofilową cząsteczkę wody, a drugi B, prawdopodobnie w połączeniu z kationem metalu A, stabilizuje stan przejściowy (Rys. 17).



**Rys. 16.** Proces odwrotnej transkrypcji wirusa HIV-1 (Sarafianos *i in.*, 2001). (A) Tworzenie kopii DNA z końca 5' tRNA a następnie hydroliza zhybrydowanego fragmentu RNA przez domenę RNazy H. (B) Przesunięcie tRNA:DNA na koniec 3' matrycy. (C) Wydłużanie nici DNA i dalsza degradacja RNA za wyjątkiem PPT. (D) Synteza końca 3' drugiej nici DNA. (E) Usunięcie fragmentu PPT RNA. (F) Synteza brakujących części obu nici DNA.

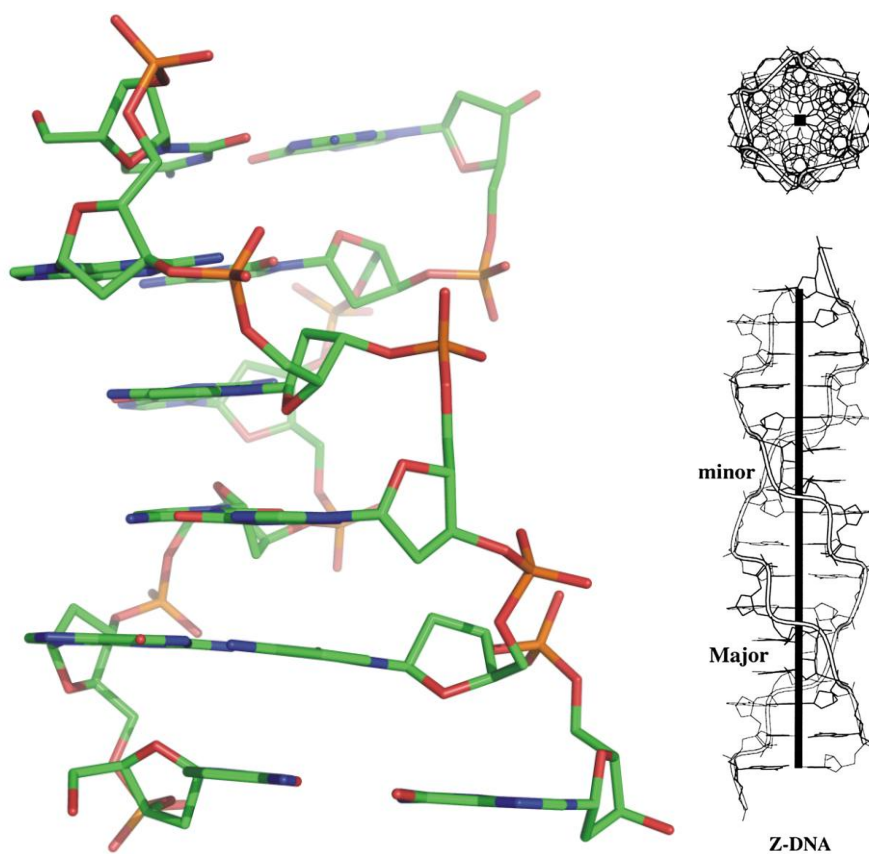


**Rys. 17.** Proponowany mechanizm działania RNazy H wirusa HIV-1 z udziałem dwóch kationów metali ( $\text{Mg}^{2+}$  lub  $\text{Mn}^{2+}$ ) oznaczonych jako A i B. Atakujący nukleofil jest pokazany na czarno ze strzałką zwróconą ku grupie fosforanowej. Kluczowa cząsteczka wody pośrednicząca w interakcji pomiędzy aminokwasem Asp498 i kationem metalu jest zaznaczona na niebiesko (Champoux & Schultz, 2008).

## II.5 Z-DNA

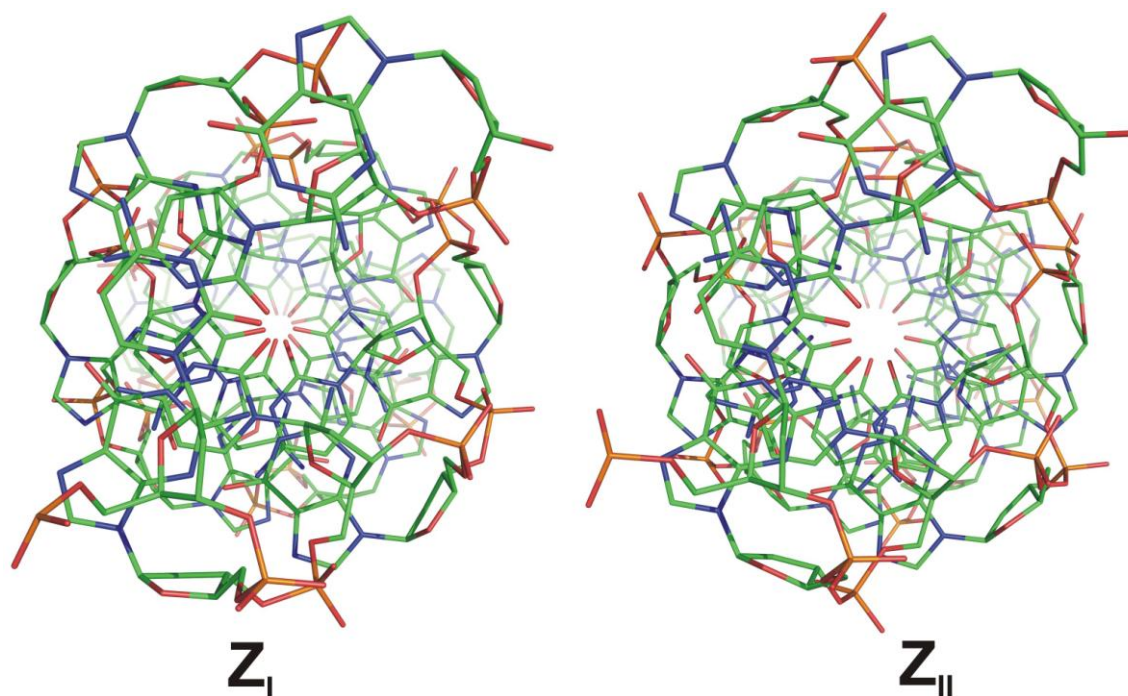
W układach z naprzemienną sekwencją typu d(pirymidyna/puryna) odpowiednio wysokie stężenie soli organicznej i/lub nieorganicznej prowadzi do powstania lewoskrętnej struktury Z-DNA (Rys. 18). W odróżnieniu od innych struktur DNA jednostką powtarzalności dla tej formy jest dinukleotyd. W przypadku Z-DNA nukleotydy purynowe mają konformację cukru C3'-*endo*, a kąt  $\chi$  wiązania N-glikozydowego zawiera się w przedziale 55–80° (średnia –62°; konformacja *syn*). Dla nukleotydów pirymidynowych cukier ma geometrię C2'-*endo*, a kąt  $\chi$  wynosi od –145° do –160° (średnia –152°; konformacja *anti*). Skok helisy dla Z-DNA, na który przypada 12 par zasad, wynosi 44,6 Å. Analiza struktur krystalograficznych Z-DNA (Wang *i in.*, 1981), pokazała możliwość występowania dwóch ( $Z_I$  i  $Z_{II}$ ) odmiennych geometrii grup fosforanowych w tej cząsteczce. Charakterystyczne różnice między konformacjami  $Z_I$  i  $Z_{II}$  są głównie związane z innymi wartościami kątów  $\beta$  i  $\zeta$  łańcucha fosforanowego (Rys. 4, 19 i 20, Tabela 6). Szerokość

małej bruzdy dla konformacji  $Z_{II}$  jest większa o około 1 Å niż dla  $Z_I$ . Należy zaznaczyć, że w dupleksach Z-DNA mogą występować dinukleotydy, które nie zachowują reguły naprzemienności pirymidyna/puryna faworyzującej jego utworzenie (ang. *out-of-alternation base pair*). Przykładami takich sekwencji są:  $d(m^5CGGC^{m5}CG)_2$ ,  $d(m^5CGAT^{m5}CG)_2$  lub  $d(BrCGAT^{Br}CG)_2$ . Zasady pirymidynowe w takich strukturach Z-DNA mają niepreferowaną konformację *syn* (Eichman *in.*, 1999; kod PDB: 400d).

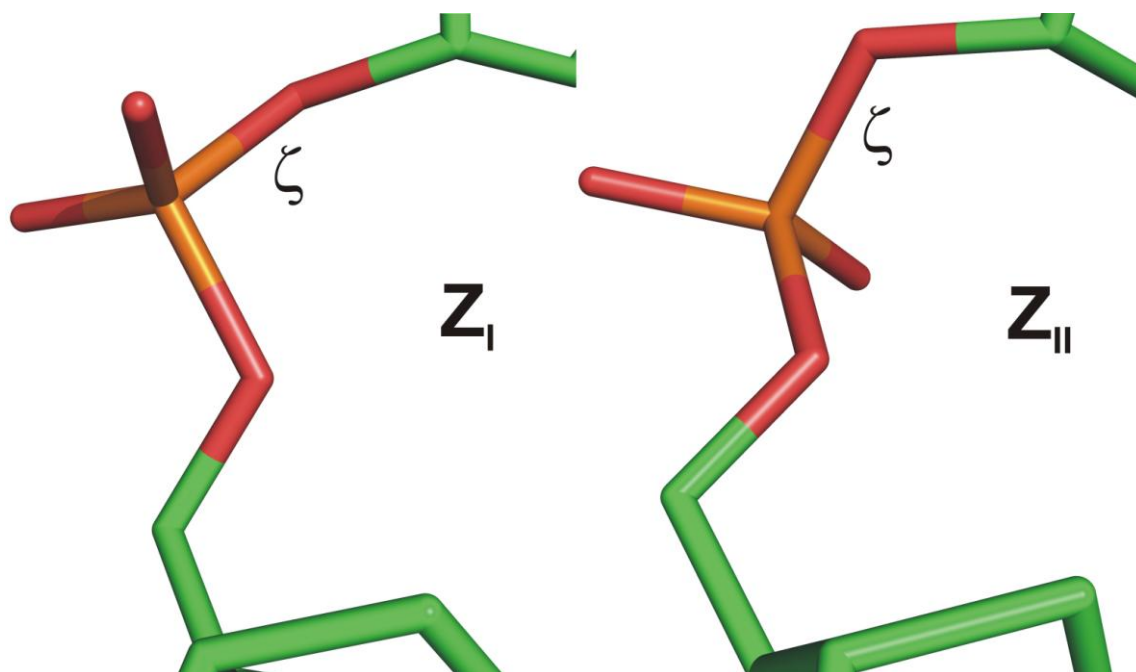


**Rys. 18.** Struktura Z-DNA; kod PDB 3p4j. (Lu & Olson, 2003).





**Rys. 19.** Widok wzdłuż osi helikalnej modeli podwójnej helisy w konformacji Z<sub>I</sub>-DNA lub Z<sub>II</sub>-DNA, kody PDB 2zna i 3zna.



**Rys. 20.** Różnice w geometrii łańcucha fosforanowego dla Z<sub>I</sub>-DNA i Z<sub>II</sub>-DNA.

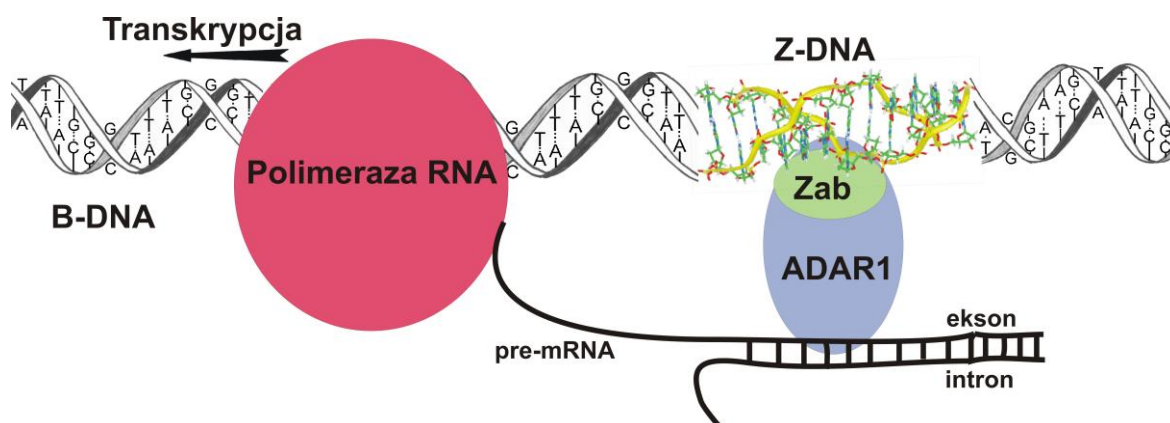


**Tabela 6.** Parametry strukturalne Z<sub>I</sub>-DNA i Z<sub>II</sub>-DNA (Saenger, 1984; Arnott, 1999; Svozil *i in.*, 2008).

Parametry strukturalne	Z <sub>I</sub> -DNA	Z <sub>II</sub> -DNA
Skok helisy (Å)	44,6	44,6
Liczba nukleotydów na jeden skręt	12	12
Konformacja reszty cukrowej	pirymidyny: C2'- <i>endo</i> puryny: C3'- <i>endo</i>	pirymidyny: C2'- <i>endo</i> puryny: C3'- <i>endo</i>
Kąt wokół wiązania	pirymidyny: 63,0	pirymidyny: 58,0
N-glikozydowego $\chi$ (°)	puryny: <b>205,0</b>	puryny: <b>213,0</b>
Kąty torsyjne (°)		
$\alpha$	210,0	169,0
$\beta$	<b>233,0</b>	<b>162,0</b>
$\gamma$	54,0	44,0
$\delta$	144,0	144,0
$\varepsilon$	63,0	58,0
$\zeta$	<b>292,0</b>	<b>63,0</b>
Odległość P – P (Å)		
CpG	6,3	6,1
GpC	7,3	8,0
Parametry helikalne (dla CpG)		
<i>helical twist</i> $\Omega_h$ (°)	–60,0	–60,0
<i>helical rise</i> (Å)	7,3	7,3
<i>inclination</i> $\eta$ (°)	7,1	7,1
<i>x-displacement</i> (Å)	3,3	3,3
Mała bruzda (Å)		
szerokość	2,0	3,0
głębokość	13,8	13,8
Duża bruzda (Å)		
szerokość	8,8	8,8
głębokość	3,7	3,7

### II.5.1 Biologiczne znaczenie Z-DNA

Sformułowane dotychczas wnioski, poparte rezultatami wieloletnich badań, potwierdzają powszechnie dziś przyjętą tezę, że formowanie się helisy Z-DNA zachodzi *in vitro*, a także *in vivo* (Herbert & Rich, 1996; Brown & Rich, 2001; Rich & Zhang, 2003; Wang & Vasquez, 2007, de Rosa *i in.*, 2013, Ng *i in.*, 2013). Odpychające oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy grupami fosforanowymi w Z-DNA będące wynikiem ich bliskiej odległości powodują, że dla powstania i stabilizacji tej formy kwasu nukleinowego potrzebna jest wysoka energia. Prawdopodobnie tworzenie Z-DNA *in vivo* jest dynamicznym procesem. Jednym z źródeł energii potrzebnej do przejścia z formy B do Z-DNA ( $\Delta G$  tworzenia struktury typu B/Z-DNA wynosi około 5 kcal/mol; Peck & Wang, 1983) mogłaby dostarczać transkrypcja. Zasugerowano, iż jednym z mechanizmów umożliwiających tworzenie się Z-DNA *in vivo* jest powstawanie ujemnej superhelikalności za przesuwaną się wzdłuż genu polimerazą RNA (Rys. 21, Brown & Rich, 2001). Typowa sekwencja d(CG)<sub>n</sub> przyjmująca formę Z-DNA występuje częściej w organizmach prokariotycznych niż eukariotycznych (ang. *CG suppression*) w przeciwieństwie do sekwencji d(CA/GT)<sub>n</sub>, szeroko rozpowszechnionej w genomach eukariotów. Ponadto ostatnie badania wskazują na znaczenie w regulacji transkrypcji regionów DNA, bogatych w niemetylowane fragmenty (CpG)<sub>n</sub> (ang. *CpG island*, Illingworth & Bird, 2009; Deaton & Bird, 2011).



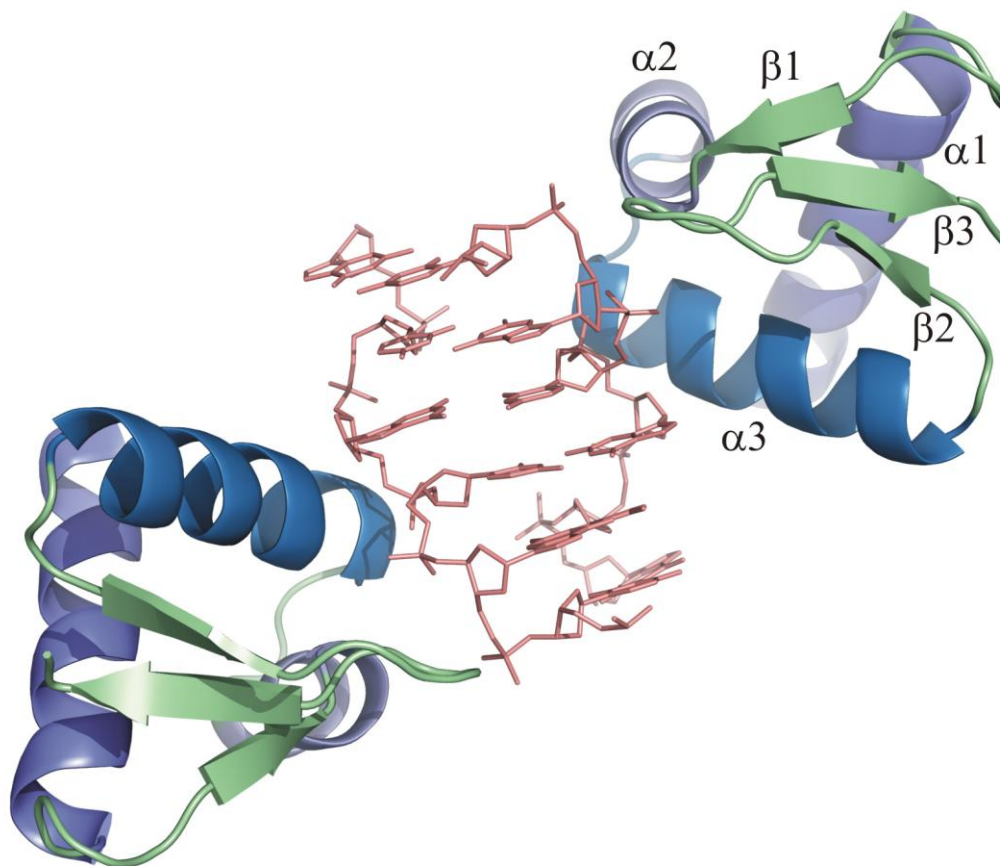
**Rys. 21.** Postulowana stabilizacja Z-DNA poprzez powstawanie ujemnej superhelikalności za przesuwaną się wzdłuż genu polimerazą RNA (Brown & Rich, 2001).

### II.5.2 Białka wiążące Z-DNA

Białka wiążące Z-DNA zostały zidentyfikowane i wyizolowane z wirusa krowianki (Liu *i in.*, 2001; Kwon & Rich, 2005), *Escherichia coli* (Blaho & Wells, 1987; Lafer *i in.*, 1988), drożdży (Zhang *i in.*, 1992), muszki owocowej (Nordheim *i in.*, 1982; Arndt-Jovin *i in.*, 1993), pszenicy (Lafer *i in.*, 1985), danio pręgowatego (Rothenburg *i in.*, 2005), krwi drobiu (Herbert *i*

*in.*, 1993), szczura (Rothenburg *i in.*, 2002), wołu (Rohner *i in.*, 1990) oraz z jąder komórek ludzkich (Krishna *i in.*, 1990; Leith *i in.*, 1988; Rothenburg *i in.*, 2002; Pham *i in.*, 2006).

Pomimo że funkcja większości z wyżej wymienionych białek wiążących Z-DNA nie została jeszcze w pełni ustalona, to istniejące dowody sugerują, że odgrywają one ważną rolę w ekspresji genów, rekombinacji DNA, redagowaniu (edycji) RNA, rozwoju nowotworów i patogenezie wirusowej (Rich & Zhang, 2003, Ng *i in.*, 2013). Wśród białek wiążących Z-DNA najlepiej poznane są deaminaza adenozynowa dwuniciowego RNA (ADAR1; ang. *adenosine deaminases acting on RNA*), E3L i DLM-1 (Schwartz *i in.*, 2001). Wszystkie te trzy białka mają domenę *Zα* wykazującą wysoką homologię sekwencji.



**Rys. 22.** Ogólny zarys domeny *Zα* wiążącej Z-DNA. Przedstawiono aminokwasy od 134 do 198 z dwóch symetrycznie równoważnych domen *Zα* oraz dupleks o sekwencji d(CGCGCG)<sub>2</sub>; kod PDB 1qbj.

Rodzina enzymów ADAR przekształca adenozyne do inozyny poprzez hydrolityczną deaminację dsRNA. Dwie (ADAR1 i ADAR2) lub trzy domeny (ADAR3) determinują miejsce wiązania się enzymu z kwasem nukleinowym. Białko ADAR1 posiada w swej strukturze specyficzny 70-aminokwasowy region, umożliwiający identyfikację aktywnych transkrypcyjnie regionów DNA. Region ten, tzw. domena *Zα*, wykazuje specyficzność wiązania się do Z-DNA

(Rys. 22, Sacharczuk *i in.*, 2004). Domena  $Z\alpha$  i  $Z\beta$  wchodzi w skład domeny  $Z\alpha\beta$  (Rys. 21) odpowiadającej za rozpoznanie sekwencji DNA, do której przyłącza się enzym ADAR (Schwartz *i in.*, 2001).

Kompleks białkowy BAF (ang. *BRG1-associated factor*) reguluje w komórkach ssaków efektywność ekspresji ponad 80 genów w wyniku modyfikacji struktury chromatyny. Badając mechanizm tej regulacji, wykazano, że polega on na utworzeniu kompleksu pomiędzy białkami NFI/CTF (ang. *nuclear factor I/CAAT box transcription factor*) z odpowiednim promotorem CSF1 (ang. *Macrophage colony-stimulating factor 1*). Aktywacja CSF1 przebiega poprzez utworzenie Z-DNA pod wpływem kompleksu BAF. Kontrolowane przez BAF przejście  $B \rightarrow Z$ -DNA powoduje stabilizację struktury chromatyny na promotorze CSF1 (Liu *i in.*, 2001).

Pomimo że *in vivo* przejście formy B-DNA w Z-DNA jest głównie wiązane z uwolnieniem energii zgromadzonej w ujemnie superhelikalnych zwojach DNA, pod uwagę należy brać także stabilizujący wpływ na Z-DNA powszechnie obecnych w komórkach poliamin biogennych (głównie spermina<sup>4+</sup> i spermidyna<sup>3+</sup>; Thomas *i in.*, 1991; Thomas & Thomas, 1994; Howell *i in.*, 1996; Brooks, 2013).

## II.6 Oddziaływania DNA z kationami poliamin i metali

Aminy biogenne: putrescyna<sup>2+</sup> (Put<sup>2+</sup>) –  $^+\text{NH}_3(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$ , spermidyna<sup>3+</sup> (Spd<sup>3+</sup>) –  $^+\text{NH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2^+(\text{CH}_2)_4\text{NH}_3^+$  i spermina<sup>4+</sup> (Spm<sup>4+</sup>) –  $^+\text{H}_3\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2^+(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2^+(\text{CH}_2)_3\text{NH}_3^+$  są alifatycznymi cząsteczkami występującymi w organizmach w postaci sprotonowanych polikationów (wartości  $\text{pK}_a$  zawarte są w przedziale 7,9 – 10,9). Aminy biogenne oddziałują z różnymi komponentami komórkowymi (Coben, 1998; Thomas & Thomas, 2001). Poliaminy odgrywają ważną rolę w regulowaniu proliferacji i różnicowania komórek. Wykazano, że obniżona aktywność enzymu odpowiedzialnego za syntezę poliamin w organizmie (dekarboksylazy ornityny) prowadzi do zmiany struktury chromatyny, niewydolności w naprawie zmian w DNA wywołanych promieniami ultrafioletowymi i promieniami X oraz wstrzymania proliferacji komórek. Badania *in vitro* pokazują, że spermina<sup>4+</sup> wykazuje ochronne działanie przeciw uszkodzeniom DNA wywołanym przez nadtlutki, promieniowanie jonizujące, szybkie neutrony czy układy  $\text{metal}^{n+}/\text{H}_2\text{O}_2$ . Poliaminy mogą kompleksować odpowiedzialne za generowanie ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*, reaktywne formy tlenu) kationy metali takich jak miedź czy żelazo. Badania pokazują, że wpływ poliamin na ekspresję genów jest prawdopodobnie efektem zarówno ich oddziaływań z DNA i/lub z białkami (Wang *i in.*, 2002). Poliaminy modulują oddziaływania białko–DNA (Panagiotidis *i in.*, 1995; Wang & Casero,

2006). Substancje te powodują stabilizację chromatyny i kondensację DNA (Bloomfield, 1997; Iacomino *i in.*, 2012). Badano również wpływ analogów poliamin biogennych (między innymi norsperminy<sup>4+</sup> –  $^+H_3N(CH_2)_3NH_2^+(CH_2)_3NH_2^+(CH_2)_3NH_3^+$ ) na zjawisko kondensacji DNA. Stwierdzono, że heksaaminy są bardziej efektywne od pentaamin w kondensacji DNA, a te z kolei, bardziej od tetraamin, co świadczy o dominującej roli oddziaływań niekowalencyjnych między sprotonowanymi aminami biogennymi a DNA (Vijayanathan *i in.*, 2004). Z drugiej strony badania homologów sperminy<sup>4+</sup> wykazały, że mimo jednakowego ładunku, różnica w budowie cząsteczki wpływa na zdolność kondensacji DNA (Vijayanathan *i in.*, 2001). Poliaminy mogą również powodować transformację struktury B-DNA do Z-DNA i A-DNA. Obserwowano także wzrost temperatury topnienia DNA w obecności poliamin (Wang & Casero, 2006).

Rozwiązano strukturę krystalograficzną kompleksu sperminy<sup>4+</sup> z oktamerem d(GTGTACAC)<sub>2</sub>. Stwierdzono, że Spm<sup>4+</sup> nie oddziałuje z grupami fosforanowymi. Amina ta tworzy wiązania wodorowe z atomami O6 i N7 guaniny oraz O4 tyminy we fragmencie GTGT (kod PDB: 1dns; Jain *i in.*, 1989). Dla dupleksu d(CGATCG)<sub>2</sub> określono, że spermina<sup>4+</sup> lokuje się tylko w dużym rowku (kod PDB: 1d15; Williams *i in.*, 1990). Badania krystalograficzne nad sekwencją d(CCGGGCCCGG)<sub>2</sub> pokazały różne typy wiązania się sperminy<sup>4+</sup> z A-DNA (tylko grupy fosforanowe, tylko zasady lub grupy fosforanowe i zasady; kod PDB: 326d; Tippin & Sundaraligman, 1997). Struktura d(CGGTGG):d(CCACCG) (forma B-DNA) wykazała oddziaływania Spm<sup>4+</sup> z fragmentem GTG, zawierającym parę zasad A·T mającą typ wiązań wodorowych inny niż w modelu Watsona–Cricka. Zasugerowano, że taka stabilizacja motywu GTG, występującego często w regionach regulatorowych DNA, może być istotna dla oddziaływań białko–DNA (kod PDB: 206d; Tari & Secco, 1995).

Jony metali grup głównych i przejściowych występują w każdym organizmie żywym. Jednak w zależności od rodzaju organizmu obecność i stężenie danego kationu metalu jest zmienne (Hud, 2009; Sigel *i in.*, 2011; Sigel *i in.*, 2012). Jony te w postaci częściowo lub całkowicie hydratowanej mogą wiązać się pośrednio lub bezpośrednio z cząsteczkami DNA (Tabela 7). Kationy metali mogą wpływać na szybkość i dokładność syntezy DNA, tworzenie kompleksów białko–DNA, a nawet inicjować mutagenezę i karcenogenezę. Za pomocą spektroskopii Ramana ustalono, że atomy N7 zasad purynowych i N3 pirymidynowych są głównymi miejscami koordynacji jonów metali, które to preferencyjnie wiążą się z zasadami DNA w następującej kolejności  $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+} > Fe^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$  (Duguid *i in.*, 1993).

**Tabela 7.** Miejsca wiązania się metali z cząsteczkami DNA (Anastassopoulou, 2003).

<b>Zasady azotowe</b> $\text{Ag}^+, \text{Hg}^+, \text{Pt}^{2+}$
<b>Grupy fosforanowe i zasady</b> $\text{Mg}^{2+}, \text{Ba}^{2+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Co}^{3+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Cd}^{2+}, \text{Pb}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Fe}^{2+}$
<b>Grupy fosforanowe</b> $\text{Li}^+, \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Rb}^+, \text{Cs}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Sr}^{2+}, \text{Cr}^{3+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Lantanowce}$

Wiele uwagi poświęcono kondensacji DNA wywołanej przez kationy metali. Słowo kondensacja generalnie odnosi się do sytuacji, w której agregat ma określony rozmiar i uporządkowaną morfologię, jak to jest dyskutowane w pracy Bloomfielda (1997). Częstymi obiektami badań są kompleks heksaaminakobaltu  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  (cohex) i jony  $\text{Mn}^{2+}$  (Kankia *i in.*, 2001). Stwierdzono, że cohex powoduje wyraźną kondensację DNA, a jego efektywność zależy od długości helisy DNA. Podobnie kondensację taką mogą wywołać kationy i kompleksy innych metali przejściowych (Ma & Bloomfield, 1994). W pH  $\sim 8,5$  powstają kompleksy pomiędzy dwuniciowym DNA, a jonami  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  lub  $\text{Co}^{2+}$ . Takie formy kompleksów nazwano M-DNA (Lee *i in.*, 1993; Aich *i in.*, 1999). Podczas tworzenia się takich związków jony metali zastępują iminowe protony guaniny i tyminy w DNA. Formowanie się struktury M-DNA zależy od stężenia B-DNA, charakteru danego metalu i wartości pH. Cząsteczki M-DNA ulegają przemianie do B-DNA po obniżeniu pH lub dodaniu do układu EDTA. Widma dichroizmu kołowego w regionach UV wykazują strukturalne podobieństwo M-DNA do formy B-DNA. Substancje interkalujące (np. pewne leki) nie wiążą się z M-DNA, prawdopodobnie dlatego, że kationy metalu odpychają dodatnio naładowane cząsteczki interkalatora. W obecności kationów  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  zaobserwowano specyficzną strukturę \*H-DNA, odmienną zarówno od formy H-DNA jak i B-DNA. Efektywność w tworzenia się \*H-DNA maleje w szeregu  $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} >> \text{Mn}^{2+}$  (Bernues *i in.*, 1990).

### II.6.1 Oddziaływania Z-DNA z kationami poliamin i metali

Rodzaj otoczenia jonowego wokół cząsteczki kwasu nukleinowego ma wpływ na jej przekształcenia strukturalne. Przykładem takich przekształceń jest transformacja formy B-DNA do Z-DNA następująca pod wpływem obecności (w odpowiednich stężeniach) kationów metali lub poliamin biogennych.

Badania dichroizmu kołowego (CD; ang. *circular dichroism*) prowadzone *in vitro* pokazały, że jednowartościowe kationy metali w wysokim stężeniu (~2,3 M dla Na<sup>+</sup> i 4,7 M dla Cs<sup>+</sup>) powodują przejście od formy B-DNA do Z-DNA (Pohl & Jovin, 1972; Wang & Vasquez, 2007 – i bibliografia tamże). Dwuwartościowe kationy metali drugiej grupy układu okresowego jak i metali przejściowych zdolne są do efektywniejszego wywołania przejścia B → Z w porównaniu z kationami metali jednowartościowych (minimalne stężenie wynosiło: 700 mM dla Mg<sup>2+</sup>, 100 mM dla Ca<sup>2+</sup>, 40 mM dla Ba<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, 0,005 mM dla [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup>). W przypadku sperminy<sup>4+</sup> i spermidyny<sup>3+</sup> (będących polikationami w fizjologicznym pH) do spowodowania przejścia B → Z-DNA wystarczało stężenie odpowiednio 2 μM i 50 μM. Otrzymanie formy Z-DNA jest możliwe przy niższych stężeniach kationów metali dla sekwencji d(CG)<sub>n</sub>, zawierających metylowane (pozycja C5 cytozyny) lub bromowane (pozycja C8 guaniny) pochodne zasad (Azorin *i in.*, 1983; Saenger, 1984).

Począwszy od 1979 roku za pomocą badań krystalograficznych uzyskano szereg informacji dotyczących oddziaływań Z-DNA z aminami biogennymi, kationami metali oraz białkami (Wang *i in.*, 1979; Shing & Mooers, 1997; Ha *i in.*, 2005) (Tabela. 8). Jednakże analiza danych dotyczących kompleksów zestawionych w Tabeli 8 wskazuje w wielu przypadkach na brak typowej korelacji pomiędzy rozdzielczością, a końcową wartością krystalograficznego wskaźnika rozbieżności *R* (zwykle wyższej rozdzielczości odpowiada niższe *R*). Budzi to wątpliwości, co do wartości prezentowanych wniosków dotyczących struktury kompleksów Z-DNA z biokationami. Konieczna jest zatem ostrożna interpretacja rozwiązanych struktur kompleksów Z-DNA–kationy<sup>n+</sup>, zarówno pod kątem geometrii cząsteczki DNA jak i sfer koordynacyjnych wokół jonów metali.

**Tabela. 8.** Zestawienie struktur krystalicznych Z-DNA z kationami metali i poliamin, zdeponowanych w PDB lub tylko opisanych w literaturze naukowej.

Sekwencja	Kation poliaminy i/lub metalu	Rozdzielczość (Å)	<i>R</i> (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB lub literatura
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup>	0,55	7,77	<i>P</i> <sub>212121</sub>	3p4j
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup>	0,60	16,00	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1i0t
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup>	1,00	18,50	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1d48
d(CGT <sup>2am</sup> ACG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup>	1,35	17,40	<i>P</i> <sub>3221</sub>	210d
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup>	1,50	17,80	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1woe
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Spw <sup>4+</sup> (a)	1,80	22,20	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1v9g <i>neutronografia</i>
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	PAW <sup>(b)</sup> (2x)	1,60	20,20	<i>P</i> <sub>212121</sub>	2ie1
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Rb <sup>+</sup> (3x)	1,70	17,50	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Dong, 2003
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> (4x)	1,00	17,50	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1dcg
d( <sup>m5</sup> CGUA <sup>m5</sup> CG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> (2x)	1,30	20,80	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1d41
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	1,30	21,30	<i>P</i> <sub>32</sub>	4fs5
d(CGCG <sup>F</sup> UG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	1,50	17,20	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1dnf
d(CGCGTG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	1,50	20,00	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(TGCGCA) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> (2x)	1,64	21,20	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1ljx
d( <sup>Br</sup> UGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	2,25	15,60	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1da1
d(pCGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup>	3,00	18,20	<i>C</i> <sub>2221</sub>	392d
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Ca <sup>2+</sup>	1,30	19,50	<i>P</i> <sub>3221</sub>	4fs6
d(aminohexyl-pCG <sup>Br</sup> CGCG)	Ba <sup>2+</sup>	1,40	16,40	<i>C</i> <sub>2</sub>	Jean <i>i in.</i> , 1993



**Tabela. 8. cd.** Zestawienie struktur krystalicznych Z-DNA z kationami metali i poliamin.

Sekwencja	Kation poliaminy i/lub metalu	Rozdzielczość (Å)	<i>R</i> (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB lub literatura
d( <sup>m5</sup> CG <sup>m5</sup> CGTG)	Ba <sup>2+</sup>	1,40	19,70	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Ba <sup>2+</sup>	1,67	21,70	<i>P</i> <sub>212121</sub>	3fqb
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Ba <sup>2+</sup>	1,67	18,90	<i>P</i> <sub>212121</sub>	4e2r
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Ba <sup>2+</sup>	1,72	20,40	<i>P</i> <sub>21</sub>	4e4o
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Ba <sup>2+</sup>	1,86	21,60	<i>P</i> <sub>65</sub>	4e60
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Mn <sup>2+</sup> (2x)	1,61	20,30	<i>P</i> <sub>21</sub>	4dwy
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Mn <sup>2+</sup>	1,76	22,70	<i>P</i> <sub>65</sub>	4dy8
d(CGCGTG) <sub>2</sub>	Mn <sup>2+</sup>	2,15	26,90	<i>C</i> <sub>2221</sub>	3g2r
d(CACGCG):d(CGCGTG)	Mn <sup>2+</sup> (2x)	2,80	16,70	<i>P</i> <sub>21</sub>	3fq5
d(CGCGTG) <sub>2</sub>	Co <sup>2+</sup>	1,50	19,60	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(TGCGCA) <sub>2</sub>	[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> (2x)	1,30	11,70	<i>P</i> <sub>212121</sub>	362d
d(CACG <sup>I</sup> UG) <sub>2</sub>	[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> (2x)	1,30	16,70	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1omk
d(GCGCGCG)	[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup> (2x)	1,65	18,40	<i>P</i> <sub>212121</sub>	331d
d(CGTACGTACG) <sub>2</sub>	[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	2,00	25,00	<i>P</i> <sub>65</sub>	1dn8
d( <sup>m5</sup> CGUA <sup>m5</sup> CG) <sub>2</sub>	Cu <sup>2+</sup> (3x)/CuCl <sub>2</sub>	1,30	20,90	<i>P</i> <sub>212121</sub>	1d40
d(CGCGTG) <sub>2</sub>	Cu <sup>2+</sup>	1,50	18,00	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,20	20,00	<i>P</i> <sub>212121</sub>	Ho <i>i in.</i> , 1987
d(CGCGCA):d(TGCGCG)	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,54	19,10	<i>P</i> <sub>212121</sub>	2hto
d(TGCGCG):d(CGCGCA)	[Ru(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	2,60	26,70	<i>P</i> <sub>65</sub>	2htt
d(CACGTG) <sub>2</sub>	Spm <sup>4+</sup> /13D <sup>(c)</sup>	1,20	18,30	<i>P</i> <sub>212121</sub>	2f8w
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> (2x)/Spm <sup>4+</sup> (2x)	1,00	18,00	<i>P</i> <sub>212121</sub>	131d

**Tabela. 8. cd.** Zestawienie struktur krystalicznych Z-DNA z kationami metali i poliamin.

Sekwencja	Kation poliaminy i/lub metalu	Rozdzielczość (Å)	R (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB lub literatura
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /Cu <sup>2+</sup> (6x)	1,20	19,80	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1d39
d(Cp <sub>Se</sub> GCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup>	1,10	9,70	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1vro
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup>	0,95	8,60	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1ick
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup> (2x)	0,90	14,00	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2dcg
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /104 <sup>(d)</sup> (2x)	1,00	16,50	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1dj6
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> (2x)/TER <sup>(e)</sup> (2x)	1,00	19,00	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	336d
d(GCGCGCG):d(CCGCGCG)	Mg <sup>2+</sup> /[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,80	20,90	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	312d
d( <sup>m5</sup> CGUA <sup>m5</sup> CG) <sub>2</sub>	Cu <sup>2+</sup> (3x)/CuCl <sub>2</sub>	1,30	20,90	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	1d40
d(CGCGTG) <sub>2</sub>	Cu <sup>2+</sup>	1,50	18,00	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mn <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup>	0,75	7,09	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<b>4hig ta praca</b>
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Co <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	1,50	19,60	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Co <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup>	1,50	23,70	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	Gao <i>i in.</i> , 1993
d(GCGCGCG):d(CCGCGCG)	Mg <sup>2+</sup> /[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,80	20,90	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	312d
d( <sup>m5</sup> GCGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,68	20,70	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	313d
d(GCGCGCG):d(TCGCGCG)	Mg <sup>2+</sup> /[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,90	19,10	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	314d
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Mg <sup>2+</sup> /[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ] <sup>3+</sup>	1,25	18,00	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	Gessner <i>i in.</i> , 1985
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Zn <sup>2+</sup> (2x)/Spm <sup>4+</sup>	0,85	9,22	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<b>4hif ta praca</b>
d(CGT <sup>2am</sup> ACG) <sub>2</sub>	[Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] <sup>2+</sup> /Spm <sup>4+</sup>	1,60	17,00	P3 <sub>2</sub> 21	211d
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (3x)/P24 <sup>(f)</sup>	1,00	16,10	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	292d

**Tabela. 8.cd.** Zestawienie struktur krystalicznych Z-DNA z kationami metali i poliamin.

Sekwencja	Kation poliaminy i/lub metalu	Rozdzielczość (Å)	<i>R</i> (%)	Grupa przestrzenna	Kod PDB lub literatura
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (3x)/Spd <sup>3+</sup>	1,00	19,10	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	293d
d(CGCGCG) <sub>2</sub>	Na <sup>+</sup> /Mg <sup>2+</sup> (3x)/Spd <sup>3+</sup>	1,00	24,40	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	2elg

Oznaczenia poliamin w Tabeli 8 przyjęto według bazy PDB:

<sup>(a)</sup> deuterowana Spm<sup>4+</sup>

<sup>(b)</sup> N-(2-aminoetylo)-N'-{2-[(2-aminoetylo)amino]etylo}etylo-1,2-diamina

<sup>(c)</sup> 1,3-diaminopropan<sup>2+</sup>

<sup>(d)</sup> N,N'-bis(2-aminoetylo)-1,2-etanodiamina

<sup>(e)</sup> termospermina<sup>4+</sup>

<sup>(f)</sup> 1-(aminoetylo)amino-4-aminobutan

Analiza informacji literaturowych wskazuje na brak danych o kompleksach wielu metali przejściowych w układach Z-DNA–metal<sup>n+</sup> czy Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup>–metal<sup>n+</sup>. W szczególności całkowicie brak jest doniesień o budowie kompleksu Z-DNA–putrescyna<sup>2+</sup>, a także B-DNA–putrescyna<sup>2+</sup> i A-DNA–putrescyna<sup>2+</sup>. Odchylenia standardowe dla pozycji atomów i długości wiązań zostały obliczone tylko dla czterech struktur (kody PDB: 362d, 3p4j, **4hif**, **4hig**).

Z grupy poliamin, spermina<sup>4+</sup> była najczęściej wykorzystana jako składnik układów krystalizacyjnych dla otrzymania monokryształów Z-DNA. Mapa gęstości elektronowej dla większości zdeponowanych struktur Z-DNA pozwoliła na identyfikację jednej cząsteczki Spm<sup>4+</sup> w części asymetrycznej komórki elementarnej. Analiza kontaktów międzycząsteczkowych wykazała, że z każdym z dwóch typów upakowania (A lub B) cząsteczek Z-DNA w kryształach występuje inny sposób oddziaływań sperminy<sup>4+</sup> z tą formą DNA (Tabela 9, Brzeziński *i in.*, 2011). W niektórych układach oddziaływania Spm<sup>4+</sup> z Z-DNA mogą nieznacznie różnić się od typów tworzenia wiązań wodorowych podanych w Tabeli 9.

**Tabela 9.** Sposoby oddziaływań kationu sperminy<sup>4+</sup> z Z-DNA na podstawie badań krystalograficznych.

Wiązania wodorowe Typ oddziaływania A (PDB 2dcg)	Wiązania wodorowe Typ oddziaływania B (PDB 1i0t)
N1_Spm <sup>4+</sup> ...OP1_G6	N1_Spm <sup>4+</sup> ...OP1_C3
N1_Spm <sup>4+</sup> ...OP2_C9	N1_Spm <sup>4+</sup> ...OP1_G12
N5_Spm <sup>4+</sup> ...OP2_C5	N5_Spm <sup>4+</sup> ...OP2_C11
N10_Spm <sup>4+</sup> ...N7_G8	N10_Spm <sup>4+</sup> ...N7_G8
	N10_Spm <sup>4+</sup> ...OP2_C9
N14_Spm <sup>4+</sup> ...N7_G4	N14_Spm <sup>4+</sup> ...N7_G10
N14_Spm <sup>4+</sup> ...O6_G4	N14_Spm <sup>4+</sup> ...O6_G2
	N14_Spm <sup>4+</sup> ...O6_G10

W przypadku struktury o kodzie PDB 131d obok sperminy<sup>4+</sup> oddziałującej według typu B, mapa gęstości elektronowej wskazała na obecność drugiej Spm<sup>4+</sup> usytuowanej w małej bruzdzie dupleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub> (Tabela 10, Brancroft *i in.*, 1994).

**Tabela 10.** Wiązania wodorowe Spm<sup>4+</sup> w małej bruzdzie Z-DNA (kod PDB 131d).

Spermina <sup>4+</sup>	
Wiązanie wodorowe	Długość (Å)
N1_Spm <sup>4+</sup> ...OP2_G2*	3,46
N1_Spm <sup>4+</sup> ...H <sub>2</sub> O	2,52
N5_Spm <sup>4+</sup> ...O2_C1*	3,10
N5_Spm <sup>4+</sup> ...O2_C7	2,82
N10_Spm <sup>4+</sup> ...O2_C5	2,92
N10_Spm <sup>4+</sup> ...O2_C9	3,07
N14_Spm <sup>4+</sup> ...OP1_G10	2,64
N14_Spm <sup>4+</sup> ...H <sub>2</sub> O	3,08
N14_Spm <sup>4+</sup> ...H <sub>2</sub> O	2,86

\*) cząsteczka symetrycznie równoważna

W bazach danych zostały zdeponowane dwie struktury Z-DNA–Spd<sup>3+</sup> (kody PDB: 293d i 2elg). Obie prezentują odmienny typ oddziaływania Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup>. W sieci krystalicznej kompleksu Z-DNA–Spd<sup>3+</sup> otrzymanego w temperaturze 4°C (Ohishi *i in.*, 1996), poliamina ulokowana jest pomiędzy sąsiednimi dupleksami DNA tworząc wiązania wodorowe z grupą fosforanową guaniny 8 (atomy N1\_Spd<sup>3+</sup> i N6\_Spd<sup>3+</sup>) i cząsteczkami wody (atom N10\_Spd<sup>3+</sup>). Dla tej samej sekwencji d(CGCGCG)<sub>2</sub> krystalizowanej w temperaturze 10°C stwierdzono, że spermidyna<sup>3+</sup> ulokowana jest w małej bruździe Z-DNA i tworzy następujące wiązania wodorowe: N1\_Spd<sup>3+</sup>...N2\_G12, N6\_Spd<sup>3+</sup>...O2\_C7 oraz N10\_Spd<sup>3+</sup>...H<sub>2</sub>O (3x) (Ohishi *i in.*, 2007).

Poza Spm<sup>4+</sup> i Spd<sup>3+</sup> w bazach danych dostępne są struktury kompleksów Z-DNA z pięcioma innymi poliaminami, zarówno występującymi naturalnie (termospermina<sup>4+</sup>, 1,3-diaminopropan<sup>2+</sup>; Kuehn *i in.*, 1990) jak i syntetycznymi. Analiza interakcji Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup> pokazuje, że w strukturach krystalicznych łańcuch poliaminy<sup>n+</sup> zaangażowany jest w tworzenie wiązań wodorowych zarówno z atomami tlenu grup fosforanowych, atomami azotu zasad purynowych i pirymidynowych (stabilizacja struktury kwasu nukleinowego), jak i cząsteczkami wody, za wyjątkiem dwóch struktur (kody PDB: 211d, **4hif**), gdzie dla Spm<sup>4+</sup> obserwuje się tworzenie systemu wiązań wodorowych tylko z atomami tlenu szkieletu cukrowo–fosforanowego i cząsteczkami wody. Dodać jednak należy, że tego typu oddziaływania mają miejsce tylko w układach z poliaminami<sup>n+</sup> o krótkich łańcuchach alifatycznych (13D, P24, PAW).

W procesie udokładniania struktur Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup> konieczna jest staranna weryfikacja wielkości takich jak kąty i długości wiązań biocząsteczek. Jest to konsekwencją faktu, że pewna liczba opublikowanych dotychczas prac (kody PDB: 1dj6, 2elg, 2ie1, 292d, 293d, 336d) opisuje konformacyjnie błędnie wymodelowany łańcuch poliaminy<sup>n+</sup>, nie mający potwierdzenia w mapach gęstości elektronowej (Brzeziński *i in.*, 2011).

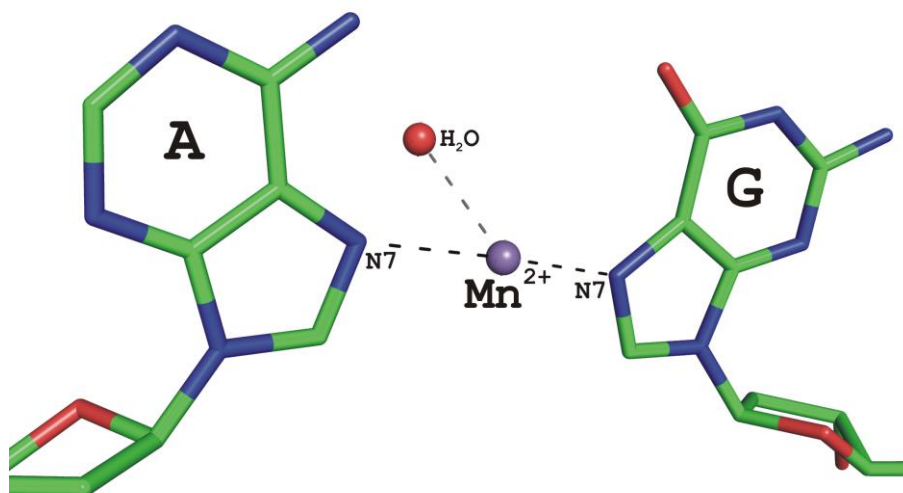
Układy krystalizacyjne opisane w zdeponowanych w PDB strukturach Z-DNA zawierają zwykle sole metali jednowartościowych. Jednakże, identyfikacja miejsc wiązania się kationów takich jak Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> jest trudna ze względu na małą gęstość elektronową tych jonów i ich nieregularną geometrię koordynacyjną. W przypadku struktur Z-DNA w mapach gęstości elektronowej zidentyfikowano tylko jony Na<sup>+</sup> (kody PDB: 131d, 2elg, 292d, 293d). Podobnie jak w przypadku innych kationów metali jednowartościowych, jon Na<sup>+</sup> oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio poprzez cząsteczki wody z grupami fosforanowymi Z-DNA, a także z grupami –NH<sub>3</sub><sup>3+</sup> z cząsteczki poliaminy<sup>n+</sup>. Typowa długość wiązania Na<sup>+</sup> – O w kryształach dla kationów [Na(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>+</sup> wynosi około 2,40 Å. W zdeponowanych w PDB strukturach Z-DNA–[Na(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>+</sup>

długość wiązania  $\text{Na}^+ - \text{O}$  zawarta jest w przedziale od 2,14 do 2,81 Å. Dla wszystkich omawianych tu oddziaływań Z-DNA–metal<sup>n+</sup> ważnym elementem weryfikacji poprawności modelu jest ocena czynników temperaturowych (ADP) (ang. *atomic displacement parameters*) – B. W literaturze naukowej opisane są także oddziaływania jonu  $\text{Rb}^+$  z Z-DNA (Dong, 2003), ale brak jest zdeponowanych współrzędnych dla tej struktury w PDB czy NDB. Kationy  $[\text{Rb}(\text{H}_2\text{O})_n]^+$  wykazują nieregularną geometrię koordynacyjną. Atomy tlenu grup fosforanowych oraz tlenu i azotu zasad Z-DNA są miejscami tworzenia wiązań wodorowych z cząsteczkami wody z kompleksu  $[\text{Rb}(\text{H}_2\text{O})_n]^+$ .

Liczba rozwiązanych struktur Z-DNA z jonem  $\text{Mg}^{2+}$  jest większa niż z innymi kationami bloku s czy d. Jony  $\text{Mg}^{2+}$  tworzą akwakompleksy typu  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$ . Stwierdzono, że oddziaływanie Z-DNA z kationem  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$  zachodzi albo przez bezpośrednią koordynację (ang. *innersphere*) jonu  $\text{Mg}^{2+}$  przez atom N7 guaniny, lub pośrednio (ang. *outersphere*; *water-mediated*) przez cząsteczki wody i atomy tlenu grup fosforanowych i O6 guaniny. W kompleksach Z-DNA jony  $\text{Mg}^{2+}$  mają zwykle całkowicie wypełnioną oktaedryczną sferę koordynacyjną. Długości wiązania koordynacyjnego  $\text{Mg}^{2+}$ –N7 zawarte są w przedziale od 2,21 do 2,43 Å. Odległości  $\text{Mg}^{2+} - \text{H}_2\text{O}$  wykazują większe zróżnicowanie i mieszczą się w zakresie 1,97 Å – 2,40 Å. Dla kilku struktur Z-DNA (kody PDB: 1dcg, 336d, 292d, 293d, 2elg) bliska (w granicach 2,82 – 3,12 Å) lokalizacja dwóch kationów  $\text{Mg}^{2+}$  powoduje, że generowany jest układ z mostkującymi cząsteczkami wody. Analiza struktury szkieletu cukrowo–fosforanowego Z-DNA wykazała możliwość istnienia dwóch konformacji grup fosforanowych nazwanych Z<sub>I</sub> i Z<sub>II</sub> (rozdział II.5; Rys. 19 i 20, Tabela 6, Wang *i in.*, 1981). Zaobserwowano, że konformacja Z<sub>II</sub> stabilizowana jest głównie przez oddziaływania atomów tlenu grup fosforanowych z akwakompleksami jonów metali. Ostatnie badania wskazują, że dla wysokich stężeń (500 mM)  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  kationy te oddziałują tylko z grupami fosforanowymi Z-DNA. Ponadto, przy takich stężeniach kationów szkielet cukrowo–fosforanowy dupleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub> przyjmuje tylko konformację Z<sub>II</sub> (Chatake & Sunami, 2013). Grupy fosforanowe w Z-DNA mogą wykazywać nieuporządkowanie i przyjmować podwójne konformacje w obecności kationów metali (Subirana & Soler-Lopez, 2003).

W bazach danych PDB i NDB zostały zdeponowane struktury kompleksów Z-DNA z jonami  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ ,  $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  i  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_3]^{2+}$  (Tabela 8). Dla kilku kompleksów Z-DNA–metal<sup>n+</sup>, zaobserwowano koordynację kationów metali ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) do dwóch zasad azotowych z sąsiadujących ze sobą dupleksów Z-DNA (Rys. 23). Struktury kompleksów Z-DNA– $\text{Ba}^{2+}$ , Z-DNA– $\text{Cu}^{2+}$ , Z-DNA– $\text{Co}^{2+}$  i Z-DNA– $\text{Spm}^{4+}$ – $\text{Co}^{2+}$ , dla których stwierdzono, że kation metalu mostkuje dwie zasady, zostały opisane w literaturze (Gao

*i in.*, 1993; Jean *i in.*, 1993), ale ich współrzędne nie są dostępne w bazach danych. Część asymetryczna komórki elementarnej kompleksu Z-DNA–Spm<sup>4+</sup>–Co<sup>2+</sup> zawiera jeden kation Co<sup>2+</sup>, oraz dwa Spm<sup>4+</sup> (Gao *i in.*, 1993).



**Rys. 23.** Kation Mn<sup>2+</sup> oddziałujący z atomami N7 adeniny i N7 guaniny; kod PDB: 3fq5.

Głównym miejscem koordynacji kationów metali przejściowych w oddziaływaniach ich akwa- i amiokompleksów z Z-DNA są atomy N7 guaniny. Ligandy wewnętrznej sfery koordynacyjnej tych kompleksów tworzą liczne wiązania wodorowe z cząsteczkami wody, grupami fosforanowymi i/lub zasadami kwasu nukleinowego i podobnie jak poliaminy<sup>n+</sup> znacząco wpływają na otoczenie jonowe kwasu nukleinowego, a tym samym na jego strukturę i właściwości. Analiza długości wiązań i kątów dla sfer koordynacyjnych kationów metali, czynników temperaturowych ( $B > 50 \text{ Å}^2$ ), współczynników obsadzenia ( $< 0,20$ ) wykazuje błędy popełnione w czasie budowania modeli Z-DNA–metal<sup>n+</sup>. W wielu przypadkach sfera koordynacyjna kationu metalu nie jest całkowicie wypełniona.

Pomimo iż istnieje duża liczba danych z CSD (ang. *Cambridge Structural Database*; Allen, 2002) i literaturowych omawiających kompleksy poliamina<sup>n+</sup>–metal<sup>n+</sup> w roztworze (Lomozik *i in.*, 2005), to w żadnej z dotychczasowych struktur typu Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup>–metal<sup>n+</sup> nie zaobserwowano bezpośredniej koordynacji metalu do poliaminy<sup>n+</sup>.

W porównaniu do formy B-DNA atom donorowy N7 guaniny w Z-DNA jest bardziej dostępny (różnica budowy dużej bruzdy) dla wiązania cząsteczek wody i koordynacji kationów metali. Badania pokazały, że ta cecha Z-DNA czyni te biocząsteczki podatnymi na działanie czynników utleniających takich jak np. kompleksy Ni<sup>2+</sup> (Tang *i in.*, 1999). Uszkodzenia Z-DNA (np. alkilacja atomów O6 lub N7 guaniny), w porównaniu z B-DNA, są bardziej odporne na działanie enzymów naprawczych, czego przykładem może być nieefektywne działanie

glikozylazy i metylotransferazy DNA (Lagravere *i in.*, 1984; Boiteux *i in.*, 1985). Możliwa jest zatem akumulacja endogennych (oksydacyjnych) uszkodzeń DNA w regionach mających konformację Z-DNA, przyczyniająca się do niestabilności genetycznej.

## II.7 Oddziaływania RNA z kationami poliamin i metali

Wiadomo, że poliaminy wiążą się efektywniej z helisą RNA, niż z jednoniciowym RNA czy helisą DNA (Higashi *i in.*, 2008). Obecność amin biogennych stwierdzono głównie w kompleksach RNA–poliamina<sup>n+</sup> podczas badania materiału z wątroby szczurów, limfocytów bydłych i komórek *Escherichia coli* (Tabela 11; Igarashi & Kashiwagi, 2006).

**Tabela 11.** Rozpowszechnienie poliamin w komórkach limfocytów bydłych i wątroby szczura (pH 7,5, 2 mM Mg<sup>2+</sup>, 150 mM K<sup>+</sup>) oraz *Escherichia coli*: (pH 7,5, 10 mM Mg<sup>2+</sup>, 150 mM K<sup>+</sup>).

Występowanie poliamin <sup>n+</sup>	Limfocyty bydłe		Wątroba szczura		<i>Escherichia coli</i>	
	Spermidyna <sup>3+</sup> [mM]	Spermina <sup>4+</sup> [mM]	Spermidyna <sup>3+</sup> [mM]	Spermina <sup>4+</sup> [mM]	Putrescyna <sup>2+</sup> [mM]	Spermidyna <sup>3+</sup> [mM]
Całkowita ilość	1,33	1,58	1,15	0,88	32,2	6,88
Kompleks z DNA	0,17 (12,8%)	0,29 (18,3%)	0,05 (4,3%)	0,05 (5,7%)	3,0 (9,3%)	0,35 (5,1%)
Kompleks z RNA	0,76 (57,2%)	1,03 (65,2%)	0,90 (78,3%)	0,75 (85,2%)	15,4 (47,9%)	6,17 (89,7%)
Wolna postać	0,20 (15,0%)	0,08 (5,1%)	0,08 (7,0%)	0,02 (2,3%)	12,5 (38,8%)	0,26 (3,8%)

Mikroskopia immunoelektronowa wskazuje, że poliaminy w przeważającej mierze ułożone są zarówno w rybosomach jak i polirybosomach szorstkiej siateczki endoplazmatycznej w komórkach centralnego układu nerwowego szczurów (Fujiwara *i in.*, 1998). Oddziaływania sperminy<sup>4+</sup> z RNA są mniej rozpoznane niż z DNA, a struktury krystalograficzne (19 w bazie PDB) opisują jej wiązanie się z tRNA<sup>Phe</sup> i tRNA<sup>Asp</sup>, rybozymbem (typu *intronu II grupy*), kwadrupleksem oraz dupleksami RNA. W przypadku fragmentów helikalnych cząsteczki RNA, kation Spm<sup>4+</sup> oddziałuje poprzez wiązania wodorowe z egzocyklicznymi zasadami i/lub atomami tlenu grup fosforanowych (Deng *i in.*, 2001). Spermina<sup>4+</sup> i spermidyna<sup>3+</sup> są niezbędne dla prawidłowego procesu oddziaływania tRNA z rybosomami i regulacji jego miejsca aktywnego (Amarantos *i in.*, 2002; Ouameur *i in.*, 2010). Wyniki badań nad wpływem poliamin i ich analogów na strukturę tRNA wskazują, że tRNA<sup>Phe</sup> wiąże mocno trzy cząsteczki sperminy<sup>4+</sup> (Amarantos & Kalpaxis, 2000). Jedna z nich jest ułożona w dużej bruzdzie podwójnej helisy w regionie ramienia antykodonu, podczas gdy druga została znaleziona w głębokiej kieszeni



uformowanej przez nukleozydy w zagięciu pętli D. Trzecia cząsteczka sperminy<sup>4+</sup> zajmuje pozycję w dużej bruzdzie helisy utworzonej przez ramię akceptorowe i pętlę TΨC. Z drugiej strony badania <sup>1</sup>H-NMR sugerują wiązanie się jednej cząsteczki sperminy<sup>4+</sup> w regionie pętli TΨC tRNA<sup>Phe</sup> (Frydman *i in.*, 1996). W obecności spermidyny<sup>3+</sup> jednoniciowe oligonukleotydy zawierające wiązania diestrowe -ua- i -ca- mogą być hydrolizowane nieenzymatycznie. Spermina<sup>4+</sup> i putrescyna<sup>2+</sup> mogą zastąpić spermidynę<sup>3+</sup> w indukowaniu hydrolizy oligonukleotydu. Maksymalna szybkość hydrolizy osiągnięta jest przy stężeniach 0,1, 1,0 i 10 mM, odpowiednio dla sperminy<sup>4+</sup>, spermidyny<sup>3+</sup> i putrescyny<sup>2+</sup>. Optymalne tempo cięcia było obserwowane, kiedy grupy aminowe były oddzielone trój- lub czterometylenowym łańcuchem (Bibillo *i in.*, 1999).

Spermidyna<sup>3+</sup> była pierwszym związkiem dla którego wykazano udział takiego typu polikationu w katalitycznym cięciu przez rybozym typu *spinki* (ang. *hairpin*). Zauważono, że spermidyna<sup>3+</sup> w niskim stężeniu jest zdolna do stymulacji, zależnej od obecności Mg<sup>2+</sup>, szybkości katalitycznej reakcji z udziałem rybozumu. Przeprowadzono badania, w których zaobserwowano, że przy stężeniu 10 mM spermina<sup>4+</sup> efektywnie promuje cięcie przez rybozym typu *spinki*, z szybkością podobną jak jony Mg<sup>2+</sup> o tym samym stężeniu (Earnshaw & Gait, 1998). Stabilizując trzeciorzędową strukturę RNA, poliaminy zmniejszają stężenie kationów Mg<sup>2+</sup> wymagane do katalizy prowadzonej z udziałem rybozumu. Stwierdzono nieoczekiwanie, że przy stężeniu wyższym niż 20 μM spermina<sup>4+</sup> może zmieniać naturę cięcia przez rybozym *Neurospora VS* z powolnego typu *cis* na szybki *trans* (Olive & Collins, 1998).

Wysoce ujemny ładunek RNA przeciwdziała zwijaniu się tej cząsteczki w zwartą strukturę. Z kolei, dodatni ładunek jonów metali promuje zwijanie się w wyniku kompensacji ładunków, co prowadzi do redukcji sił odpychania między grupami fosforanowymi RNA. Dlatego też jony metali są niezbędne dla zapoczątkowania procesu zwijania się i stabilizacji trzeciorzędowej struktury RNA. Działanie niektórych kationów jest szczególnie efektywne. Przykładem może być zdolność jonów Mg<sup>2+</sup> (milimolowe stężenia) do stabilizacji trzeciorzędowej struktury RNA. Z drugiej strony, obserwuje się tylko nieznaczną stabilizację struktury w obecności kationów jednowartościowych o wysokim stężeniu (Pyle, 2002). Pojedynczy jon Mg<sup>2+</sup> zmniejsza oddziaływania elektrostatyczne wynikające z bliskiego upakowania grup fosforanowych w tym samym stopniu, co dwa kationy K<sup>+</sup> (Draper, 2004; Woodson, 2005). Ten silny wpływ jonów Mg<sup>2+</sup> na naturę RNA został rozpoznany w latach siedemdziesiątych XX wieku podczas badań nad zwijaniem się tRNA. Zmotywowało to do dalszych badań nad oddziaływaniami RNA–kationy<sup>n+</sup> (Soto *i in.*, 2007), oraz nad możliwością

bezpośredniego udziału jonów  $Mg^{2+}$  w katalitycznym mechanizmie działania rybozymów (Draper, 2004; Strobel & Cochrane, 2007).

Istnieje wiele motywów w strukturze trzeciorzędowej kwasu rybonukleinowego, do których wiążą się jony metali. Jednym z najbardziej powszechnych jest motyw par -gu- w dużej bruzdzie. Intrigującym miejscem wiązania się jonu metalu jest motyw platformy AA, który specyficznie wiąże zdehydratowane jony  $K^+$  (Pyle, 2002). Badania termodynamiczne nad oligomerem zawierającym bakteryjny motyw pętli E z 5S rRNA wskazują na specyficzność wiązania się jonów  $Mg^{2+}$  do tej sekwencji RNA (Serra *i in.*, 2002). Jony  $Na^+$  i  $Li^+$  mogą współuczestniczyć w procesie zwijania pewnych RNA, ale jednocześnie konkurując z  $K^+$  są jedną z przyczyn destabilizacji układów, których składnikiem jest RNA (Pyle, 2002).

Metale przejściowe wiążą się efektywniej do kwasów nukleinowych niż  $K^+$  i  $Mg^{2+}$ , co jest wynikiem koordynacji do endocyklicznych atomów donorowych z zasad azotowych (np. N7 puryn; Draper, 2004). Krystalograficzne badania nad wiązaniem się jonów metali ( $K^+$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Au^{3+}$  i  $Pt^{4+}$ ) z dupleksami RNA wykazały wyraźną preferencję do oddziaływania kationów dwuwartościowych z miejscami odpowiedzialnymi za tworzenie się wiązań Hoogsteena w guaninie (Ennifar *i in.*, 2003). Jony  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  wydają się najlepszymi kandydatami pod względem możliwości zastępowania  $Mg^{2+}$  w badaniach nad RNA. Jony  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$  i  $Ba^{2+}$  wiązały się "słabo" do RNA w porównaniu z innymi kationami metali. Ten podział na jony "dobrze" i "słabo" wiążące się z RNA, okazał się zgodny z szeregiem Irvinga–Williamsa trwałości kompleksów (Ennifar *i in.*, 2003). Związki koordynacyjne  $[Co(NH_3)_6]^{3+}$  i  $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$  nie są zdolne efektywnie zastąpić  $[Mg(H_2O)_6]^{2+}$ . Jony  $Pt^{4+}$  wiążą się specyficznie do fragmentu 5'-ac-3' w helisie RNA, podobnie jak to zaobserwowano dla kryształu tRNA<sup>Phe</sup> nasączonego  $K_2PtCl_6$ . Jony  $Cd^{2+}$  reagują głównie z RNA w wewnętrznej sferze kontaktu atomów N7 puryn i atomów tlenu grup fosforanowych. Lantanowce takie jak:  $Sm^{3+}$ ,  $Lu^{3+}$ ,  $Pr^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$  tworzą wiązanie koordynacyjne z dwoma atomami tlenu grupy fosforanowej lub z atomami tlenu pochodzącymi z różnych części łańcucha tRNA (Kim *i in.*, 1985). Atom O4 uracylu może być miejscem wiązania jonów  $Hg^{2+}$ . Donory N7 adeniny i N4 cytozyny w sekwencji -ac- to miejsca wiązania jonów  $Pt^{4+}$  (Kim *i in.*, 1985). Stwierdzono nieoczekiwane wiązanie się jonów  $Au^{3+}$  pomiędzy zasadami -gc- (typu Watsona–Cricka) po wcześniejszej deprotonacji atomu N1 guaniny (Ennifar *i in.*, 2003).

Aktywność większości rybozymów jest wysoce zależna od warunków jonowych. Ich katalityczne właściwości związane są z obecnością dwuwartościowych kationów metali (głównie  $Mg^{2+}$ ; Woodson, 2005; DeRose, 2003). Jony metali mogą ułatwić katalizę prowadzoną przez rybozomy przez aktywację grupy 2'-hydroksylowej, stabilizację stanu przejściowego

(neutralizacja ładunku) i ułatwienie protonacji grupy opuszczającej. Jednowartościowe jony metali w stężeniach  $\leq \sim 1$  M nie promują aktywności katalitycznej niskocząsteczkowych rybozymów (*hammerhead*, *hairpin*, *Neurospora VS*, *hepatitis delta virus*). Aktywność ta wzrasta w układach zawierających mikromolowe ilości  $Mg^{2+}$  lub innych kationów dwuwartościowych. Rezultaty te sugerują, że rybozomy zawierają miejsca wiążące specyficznie kationy dwuwartościowe i decydujące o efektywności prowadzonej przez nie reakcji katalizy. Pokazano jednak, że wysokie stężenia (rzędu 4 M) jonów  $Na^+$  i  $Li^+$  także zwiększają aktywność niskocząsteczkowych rybozymów (DeRose, 2003). RNaza P podobnie jak inne duże rybozomy jest metaloenzymem wymagającym związania się dwuwartościowych jonów metali, zarówno dla swej funkcji katalitycznej, jak i procesu zwijania. Relatywnie mało wiadomo na temat liczby lub pozycji jonów metali w RNazie P. Podstawową trudnością jest wskazanie miejsca koordynacji metalu decydującego o katalitycznej aktywności RNazy P. Badania biochemiczne wskazują, że helisa P4 RNazy P jest uniwersalnym, konserwatywnym elementem wiążącym jony metali. Zakłócenia oddziaływań z helisą P4 są przyczyną obniżenia efektywności w procesie katalizy z udziałem RNazy P. Jony  $Ca^{2+}$  promują zwijanie się i wiązanie się RNazy P z substratem pomimo zaniku jej właściwości katalitycznych. Pozwala to na obserwację natury kompleksu substrat–RNaza P (Christian *i in.*, 2006). Jony metali takich jak  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  powszechnie wykorzystywane są jako analogi kationu  $Mg^{2+}$  w eksperymentach dotyczących zwijania się cząsteczki RNA (Auffinger *i in.*, 2011).

W aspekcie badań nad oddziaływaniami kwas nukleinowy–metal<sup>n+</sup>, powstały serwery internetowe, takie jak MINAS (ang. *Metal Ions in Nucleic AcidS*; <http://www.minas.uzh.ch/>; Schnabl *i in.*, 2012) oraz MeRNA (<http://merna.lbl.gov/>; Stefan *i in.*, 2006) dostarczające informacji o aktualnym stanie wiedzy w tej dziedzinie, co ułatwia analizę porównawczą sfer koordynacyjnych metali<sup>n+</sup> i ich miejsc wiązania się do DNA czy RNA. Przydatnym może okazać się także *Solvation Web Service* do wizualizacji sfery solwatacyjnej wokół kwasów nukleinowych (<http://tatooine.u-strasbg.fr/~sws/gallery.html>) oraz program *PoseView* do wizualizacji oddziaływań białko/kwas nukleinowy z ligandami organicznymi i nieorganicznymi (<http://www.biosolveit.de/poseview/>).

### III Cel pracy

Badania biochemiczne prowadzone w celu dokładnego zrozumienia funkcjonowania kwasów nukleinowych wymagają poznania natury oddziaływań pomiędzy tą grupą biocząsteczek oraz ich reakcji z polikationami. Pomimo wieloletnich obserwacji z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik badawczych (szczególnie pomiarów dyfrakcyjnych), wiele aspektów wpływu środowiska jonowego na strukturę i funkcję kwasów nukleinowych nie zostało zbadanych i zadowalająco wyjaśnionych. Mając na uwadze powszechną obecność jonów metali i poliamin biogennych (głównie sperminy<sup>4+</sup>, spermidyny<sup>3+</sup> i putrescyny<sup>2+</sup>) w komórkach żywych, w niniejszej pracy podjęto badania doświadczalne z wykorzystaniem metodyki krystalograficznej w celu wyznaczenia struktury mało dotąd poznanych kompleksów Z-DNA–putrescyna<sup>2+</sup> i Z-DNA–poliamina<sup>m+</sup>–metal<sup>n+</sup>.

Obecnie przyjęty w literaturze naukowej mechanizm działania RNazy H wirusa HIV-1 zakłada udział *in vivo* dwóch kationów Mg<sup>2+</sup>, a także *in vitro* Mn<sup>2+</sup> i Co<sup>2+</sup>, w degradacji nici RNA z hybrydy RNA:DNA podczas procesu odwrotnej transkrypcji. Fakt ten był jednym z czynników, który wyznaczył kolejny etap zadań badawczych dotyczący struktury hybrydy RNA:DNA zawierającej trzy czwarte sekwencji polipurynowej (PPT) wirusa HIV-1, w układach z kationami organicznymi i nieorganicznymi. Zadaniem pracy było także dokonanie porównania zbadanej struktury z opublikowanymi wcześniej dwoma modelami hybrydy z sekwencją PPT.

W szczególności celem niniejszej pracy było:

- rozwiązanie struktury monokryształów kompleksów Z-DNA–kationy<sup>n+</sup>
- analiza stabilności konformacyjnej Z-DNA w badanych kompleksach
- określenie i analiza miejsc wiązania się kationów metali i amin biogennych z Z-DNA
- charakterystyka struktury hybrydy RNA:DNA z sekwencją PPT, a także jej oddziaływania w układach z kationami

## IV Materiały i metody badań

### IV.1 Odczynniki

We wszystkich eksperymentach oraz w oczyszczaniu oligonukleotydów stosowano wodę o czystości MiliQ® ([http://www.millipore.com/lab\\_water/clw4/type1](http://www.millipore.com/lab_water/clw4/type1)). Wszystkie odczynniki nieorganiczne (sole metali) i organiczne (poliaminy<sup>n+</sup>) pochodziły z *Sigma Aldrich*.

#### IV.1.1 Synteza DNA i RNA

Wszystkie oligonukleotydy DNA i RNA zsyntezowano metodą amidofosforynową na podłożu stałym (CPG; ang. *controlled pore glass*) na synteźatorze automatycznym typu ABI 392 (*Applied Biosystems*®) lub MerMade 12 (*BioAutomatization*) znajdującym się w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu.

#### IV.1.2 Odblokowanie i odcięcie DNA od podłoża stałego CPG

Do oligonukleotydu DNA na podłożu CPG dodano 2-3 ml 32% wodnego roztworu NH<sub>3</sub>. Reakcje prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 55°C, a następnie podłoże CPG odsączono i przemyto trzykrotnie 0,5 ml wody. Mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

#### IV.1.3 Odblokowanie i odcięcie RNA od podłoża stałego CPG

Do oligonukleotydu RNA na podłożu CPG dodano 2-3 ml mieszaniny 32% amoniak/etanol w stosunku objętościowym 3:1. Reakcje prowadzono przez 16 godzin w temperaturze 55°C, a następnie podłoże CPG odsączono, przemyto trzykrotnie 0,5 ml wody. Mieszaninę poreakcyjną odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

##### IV.1.3.1 Odblokowanie grupy tert-butyldimetylosililowej w pozycji 2' RNA

Oligonukleotyd RNA odcięty od podłoża rozpuszczono w 30 µl DMF (dimetyloformamid), do którego następnie dodano 270 µl trifluorowodoru trietyloaminy (TEA·3HF). Reakcje prowadzono przez 2-3 godziny w temperaturze 55°C. W celu wytrącenia RNA, do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 ml n-butanolu i pozostawiono w temperaturze -25°C przez 1 godzinę. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odwirowywano przez 10 minut w

temperaturze 4°C, z prędkością 5000 obrotów na minutę. Roztwór z nad osadu dekantowano, a osad suszono w wyparce rotacyjnej.

#### **IV.1.4 Oczyszczanie oligonukleotydów DNA i RNA**

##### **IV.1.4.1 Kolumnienki z odwróconą fazą C-18 "Sep-Pak"**

Kolumnienki z odwróconą fazą C-18 "Sep-Pak" (Waters, Flinn) posłużyły do oczyszczania oligonukleotydów RNA z małowymagających zanieczyszczeń. Przygotowywano je następująco: kolumnienki przemyto kolejno 10 ml metanolu, 10 ml acetonitrylu i 10 ml 10 mM roztworem octanu amonu. W dalszym etapie na kolumnienkę naniesiono oligonukleotyd RNA rozpuszczony w 10 ml 10 mM octanu amonu. Następnie małowymagające zanieczyszczenia wmywano z kolumnienki, przemywając ją 10 ml 10 mM octanu amonu. Wymywanie oligonukleotydów prowadzono za pomocą 5 ml roztworu acetonitryl:woda 3:7 v/v. Zebraną frakcję odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

##### **IV.1.4.2 Rozdział na płytkach TLC**

Wodny roztwór oligonukleotydu DNA lub RNA naniesiono na płytkę TLC (ang. *thin layer chromatography*), a stosowanym eluentem była mieszanina n-propanol:amoniak:woda 55:35:10 v/v/v (Xia *i in.*, 1998). Zebrane frakcje odparowano do sucha w wyparce rotacyjnej.

#### **IV.2 Spektrometria mas i pomiar stężenia oligonukleotydów**

Dla każdego zsyntetyzowanego oligomeru DNA i RNA wykonano widma spektrometrii mas MALDI w celu potwierdzenia poprawności przeprowadzonej syntezy. Pomiary stężenia oligomerów kwasów nukleinowych prowadzono w temperaturze 80°C, przy długości fali 260 nm z wykorzystaniem spektrofotometru UV Beckman DU 640.

#### **IV.3 Krystalizacja oligomerów kwasów nukleinowych**

##### **IV.3.1 Krystalizacja kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>**

Przed krystalizacją wodny roztwór oligonukleotydu d(CGCGCG)<sub>2</sub> przesączono za pomocą filtra - 0,1µm Milipore® Ultrafree-MC przy obrotach 12000/min przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Proces ten nie wpływał na stężenie roztworu oligomeru. Wodny roztwór dupleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub> o stężeniu 1,5 mM ogrzewano w temperaturze 65°C przez 12

minut, a następnie pozostawiono go przez noc do powolnego schłodzenia do temperatury pokojowej. Do sprawdzenia wstępnych warunków krystalizacji wykorzystano testowy zestaw *Nucleic Acid Mini Screen* (Hampton Research®; Berger i in., 1996). Składnikami roztworu rezerwuarowego, dla którego otrzymano najlepsze kryształy był 10% (v/v) (+/-) 2-metylo-2,4-pentanodiol (MPD), 40 mM kakodylan sodu (pH 6,0), 80 mM KCl, 12 mM NaCl i 12 mM tetrachlorek sperminy.



**Rys. 24.** Kryształ  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$ .

Krystalizacje  $d(CGCGCG)_2$  przeprowadzano przy użyciu metody kropli wiszącej przez zmieszanie 2  $\mu\text{l}$  roztworu kwasu nukleinowego z 2  $\mu\text{l}$  roztworu rezerwuarowego. Objętość roztworu rezerwuarowego, którym był 35% (v/v) MPD, wynosiła 0,5 ml. Wszystkie krystalizacje oligomeru  $d(CGCGCG)_2$  wykonano w temperaturze 19°C. Monokryształy  $d(CGCGCG)_2$  powstawały w przeciągu tygodnia osiągając rozmiary  $\sim 0,4 \times 0,1 \times 0,1$  mm (Rys. 24).

#### **IV.3.2 Krystalizacja kompleksu $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$**

Składnikami roztworu rezerwuarowego, z którego otrzymano kryształy  $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  były 10% (v/v) MPD, 40 mM kakodylan sodu (pH 6,0), 80 mM KCl, 12 mM NaCl i 12 mM (lub 24 mM) dichlorek putrescyny. Objętość roztworu rezerwuarowego, którym był 60% (v/v) MPD, wynosiła 0,5 ml. Dalsza procedura krystalizacji przebiegała tak samo jak w przypadku kompleksu  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$ .

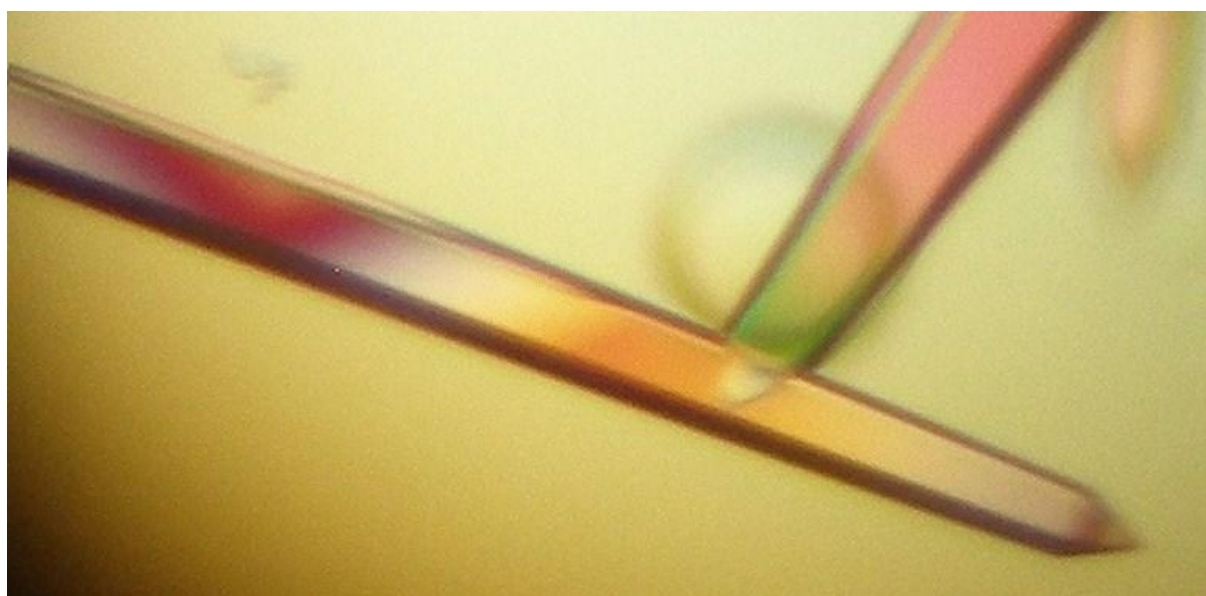
#### **IV.3.3 Nasączenie kryształów $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$ solami $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ i $\text{Cr}^{3+}$**

Monokryształy  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$  o najlepszej morfologii zostały wykorzystane do nasączenia jonami metali. Dla układu z  $\text{Mn}^{2+}$  odbywało się ono przez umieszczenie kryształu w 2  $\mu\text{l}$  roztworu rezerwuarowego i uzupełnieniem kropli krystalizacyjnej 2  $\mu\text{l}$  5 mM roztworu

MnCl<sub>2</sub>. Nasączenie kryształów kationami Zn<sup>2+</sup> i Cr<sup>3+</sup> wykonano w analogiczny sposób z użyciem 5 mM roztworów ZnCl<sub>2</sub> i [Cr(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub>. Proces nasączenia kryształów kationami metali prowadzono w czasie jednego tygodnia.

#### IV.3.4 Krystalizacja kompleksu RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>

Przed krystalizacją roztwór oligonukleotydu przefiltrowano na sączku wirówkowym - 0,1µm Milipore<sup>®</sup> Ultrafree-MC, przy obrotach 12000/min przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Krystalizację kompleksu r(5'-uaaaagaaaagg):d(5'-CCTTTTCTTTTA)–Mg<sup>2+</sup> prowadzono w temperaturze 4°C, 19°C i 30°C metodą kropli wiszącej. Stosowano 1 mM wodny roztwór RNA:DNA, który był przed krystalizacją inkubowany przez 10 minut w temperaturze 65°C, a następnie schładzany przez noc do temperatury pokojowej. Do ustalenia wstępnych warunków krystalizacji hybrydy RNA:DNA użyto testowych zestawów *Nucleic Acid Mini Screen* i *Natrix* (Hampton Research<sup>®</sup>). Początkowo kryształy powstały w temperaturze 19°C w układzie zawierającym 2 µl roztworu RNA:DNA i 2 µl roztworu: 10% (v/v) MPD, 40 mM kakodylan sodu (pH 5,5), 12 mM spermidyna<sup>3+</sup>, 40 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> (Rys. 25). Objętość roztworu rezerwuarowego, którym był 35% (v/v) MPD, wynosiła 0,5 ml.



**Rys. 25.** Kryształy RNA:DNA otrzymane w układzie krystalizacyjnym zawierającym spermidynę<sup>3+</sup> i [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i Mg(OAc)<sub>2</sub>.

Uzyskane kryształy wykazywały jednak słabe właściwości rozpraszające. Zarejestrowane dane dyfrakcyjne o rozdzielczości 3,4 Å pozwoliły tylko na określenie grupy przestrzennej (*P*<sub>6</sub>,22 lub *P*<sub>6</sub>,22).





**Rys. 26.** Kryształy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> powstałe w roztworze krystalizacyjnym zawierającym sperminę<sup>4+</sup>, [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i Mg(OAc)<sub>2</sub>

Przeprowadzono w związku z tym kolejne próby rozwinięcia i zoptymalizowania wstępnych warunków krystalizacji. Następne pomiary wykonano dla kryształów powstałych w temperaturze 19°C w warunkach: 10% (v/v) MPD, 40 mM kakodylan sodu (pH 5,5), 12 mM spermina<sup>4+</sup>, 40 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> (Rys. 26). Objętość roztworu rezerwuarowego, którym był 35% (v/v) MPD, wynosiła 0,5 ml. Pomiary dyfrakcyjne przeprowadzono za pomocą dyfraktometru *SuperNova* na Wydziale Chemii UAM, uzyskując dane o rozdzielczości 1,7 Å. Struktura została rozwiązana w grupie *P*3<sub>2</sub>21, jednakże spermina<sup>4+</sup> nie była widoczna na mapie gęstości elektronowej. Na bazie opisanych powyżej, ale nie satysfakcjonujących wyników (*R* i *R*<sub>free</sub> > 22%), prowadzono dalsze badania, które doprowadziły do uzyskania znacznie lepszych rezultatów dzięki wykorzystaniu promieniowania synchrotronowego.

Monokryształy, dla których wykonano ostateczne pomiary dyfrakcyjne powstały w temperaturze 19°C poprzez zmieszanie 2 µl roztworu RNA:DNA z 2 µl roztworu zawierającego: 7% (v/v) MPD, 40 mM kakodylan sodu (pH 5,5), 40 mM LiCl, 40 mM [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i 20 mM MgCl<sub>2</sub> (Rys. 27). Objętość roztworu rezerwuarowego, którym był 40% (v/v) MPD, wynosiła 0,5 ml.

Podjęto także próby otrzymania kryształów hybrydy RNA:DNA z sekwencją PPT w obecności kationu Mn<sup>2+</sup>. Po zastąpieniu MgCl<sub>2</sub> w ustalonych wcześniej warunkach krystalizacyjnych (w których uzyskane kryształy rozpraszały promieniowanie rentgenowskie do 1,6 Å) roztworem MnCl<sub>2</sub> o stężeniu 3 lub 5 mM, otrzymano kryształy o podobnej morfologii, jednakże nie dające rozpraszania promieniowania rentgenowskiego.



**Rys. 27.** Kryształy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> powstałe w roztworze krystalizacyjnym zawierającym LiCl, [Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]Cl<sub>3</sub> i MgCl<sub>2</sub>

#### IV.4 Dane dyfrakcyjne, rozwiązywanie struktur i ich udokładnianie

##### IV.4.1 Kompleksy d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> oraz d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>

Dane dyfrakcyjne dla kompleksów d(CGCGCG)<sub>2</sub> z jonami Mn<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> zmierzono odpowiednio z rozdzielczością 0,75 Å i 0,85 Å, na liniach X13 oraz X11 w ośrodku synchrotronowym DESY w Hamburgu i na linii 14.2 ośrodka BESSY w Berlinie (Mueller *i in.*, 2012) (Tabela 12). W obu przypadkach kryształy w czasie pomiaru znajdowały się w strumieniu par azotu (tj. w temperaturze 100 K). Roztwór rezerwuarowy posłużył jako krioprotektant. Kompletny zestaw danych dla kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> zmierzono używając dwóch kryształów. Dla pierwszego kryształu badanego w ośrodku BESSY na linii 14.2, zarejestrowano cztery zbiory danych z zastosowaniem różnych czasów pomiaru i odległości od detektora, w celu poprawnego zmierzenia zarówno silnych jak i słabych refleksów oraz uniknięcia przesycenia detektora MAR225. Zbiory 1 do 4 rejestrowane były z kątem oscylacji 1° w odległości kryształ–detektor odpowiednio: 350, 250, 140 i 70 mm, do rozdzielczości: 2,86, 1,99, 1,30 i 0,94 Å z liczbą obrazów 120, 120, 120, 129. Drugi kryształ, zmierzony w ośrodku DESY na linii X13 przy użyciu detektora MAR165, dostarczył jednego zbioru danych (480

obrazów, kąt oscylacji 0,25°) do rozdzielczości 0,75 Å. Ze względu, na gorszą jakość danych dyfrakcyjnych pierwszego kryształu w stosunku do drugiego, w czasie skalowania ze zbioru 4 wykorzystano tylko dane do rozdzielczości 1,4 Å. Charakterystyka połączonych zbiorów danych z linii X13 i 14.2 jest przedstawiona w Tabeli 13.

**Tabela 12.** Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dla struktur d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup> oraz d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup>.

Kompleks	d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm <sup>4+</sup> -Mn <sup>2+</sup>	d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm <sup>4+</sup> -Zn <sup>2+</sup>
Źródło promieniowania	X13 EMBL Hamburg/ 14.2 BESSY Berlin	X11 EMBL, Hamburg
Długość fali (Å)	0,8010/0,9184	0,8174
Temperatura (K)	100/100	100
Grupa przestrzenna	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Parametry komórki (Å)	a = 17,73, b = 31,44, c = 43,94	a = 17,79, b = 30,91, c = 44,20
Rozdzielczość (Å)	25,57 – 0,75 (0,81 – 0,75) <sup>a</sup>	17,98 – 0,85 (0,90 – 0,85) <sup>a</sup>
Efektywna rozdzielczość <sup>(b)</sup> (Å)	0,78	0,87
Liczba niezależnych refleksów	27718 <sup>(c)</sup>	19834 <sup>(c)</sup>
Kompletność (%)	87,5 (43,7)	89,3 (67,0)
Krotność obserwacji	5,76 (1,82)	5,59 (3,72)
$\langle I/\sigma I \rangle$	22,05 (8,00)	19,70 (3,54)
$R_{\text{merge}}$ <sup>(d)</sup> (%)	5,6 (6,0)	3,6 (22,2)
Wilson <i>B</i> -faktor (Å <sup>2</sup> )	4,87	8,13
<b>Udokładnianie</b>		
Program	<i>SHELXL</i>	<i>SHELXL</i>
Rozdzielczość (Å)	25,57 – 0,75	17,98 – 0,85
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu	46721 <sup>(e)</sup>	35508 <sup>(e)</sup>
Liczba refleksów testowych	1009	1004
$R/R_{\text{free}}$ <sup>(f)</sup> (%)	7,09/8,10	9,22/11,30
Liczba atomów (DNA/H <sub>2</sub> O/metal <sup>n+</sup> )	240/92/1	240/75/2
$\langle B_{eq} \rangle$ (Å <sup>2</sup> ) (łańcuch DNA: A/B/H <sub>2</sub> O/Spm <sup>4+</sup> /metal <sup>n+</sup> )	2,53/2,24/9,56/6,80/1,89	6,66/6,15/14,55/17,27/5,93
Odchylenie r.m.s.d od wartości idealnej		
długości wiązań (Å)	0,012	0,027
długości kątów (Å)	0,029	0,059

<sup>(a)</sup> Wartości w nawiasach dotyczą ostatniego przedziału rozdzielczości

<sup>(b)</sup> Rozdzielczość przy hipotetycznej wartości 100% kompletności zbioru danych, obliczona programem *DATAMAN* (Kleywegt & Jones, 1996).

<sup>(c)</sup> Pary Bijvoet uśrednione.

<sup>(d)</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_j |I_j - \langle I \rangle| / \sum_h \sum_j I_j$ , gdzie  $I_j$  jest intensywnością obserwacji refleksu  $j$ .

<sup>(e)</sup> Pary Bijvoet rozdzielone.

<sup>(f)</sup>  $R = \sum_h ||F_o| - |F_c|| / \sum_h |F_o|$  dla wszystkich refleksów, gdzie  $F_o$  i  $F_c$  są odpowiednio obserwowanymi i obliczonymi czynnikami struktury.  $R_{\text{free}}$  jest obliczone z użyciem refleksów testowych wyłączonych z udokładniania.

**Tabela 13.** Statystyka połączonych zbiorów danych dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ .

Rozdzielczość (Å)	Liczba refleksów		Kompletność (%)	$R_{\text{merge}}$ (%)	$\langle I/\sigma I \rangle$	$R_{\text{meas}}^{(a)}$ (%)	Anomal Corr <sup>(b)</sup> (%)
	zaobserwowanych	niezależnych					
1,75	37232	2748	99,9	5,3	46,70	5,5	27
1,37	30501	2749	100,0	8,0	30,32	8,4	22
1,19	15351	2750	97,4	5,9	22,89	6,5	50
1,08	12606	2744	98,5	3,3	21,66	3,7	70
1,00	12564	2781	99,4	3,5	20,80	3,9	65
0,94	12244	2775	99,7	3,8	19,66	4,3	58
0,89	11942	2758	99,9	4,2	18,47	4,8	54
0,85	11954	2804	100,0	4,6	17,62	5,2	51
0,81	10041	2814	93,1	4,9	14,93	5,6	46
0,75	5106	2795	43,7	6,0	8,00	7,5	27
<b>Cały zakres</b>	<b>159541</b>	<b>27718</b>	<b>87,5</b>	<b>5,6</b>	<b>22,05</b>	<b>5,9</b>	<b>47</b>

<sup>(a)</sup> Wskaźnik rozbieżności  $R$  niezależny od krotności (Kabsch, 2010).

<sup>(b)</sup> Współczynnik korelacji pomiędzy różnicami anomalnymi w dwóch podzbiorach otrzymanych przez przypadkowy podziału zbioru wszystkich refleksów

Dane dyfrakcyjne dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  zmierzono przy użyciu płaskiego detektora MAR555 do rozdzielczości 0,85 Å. Charakterystyka tego detektora pozwoliła na jednokrotny pomiar zarówno silnych jak i słabych refleksów (720 obrazów, kąt oscylacji 0,25°). Pakiet XDS (Kabsch, 2010) wykorzystano do wskaźnikowania, integracji i skalowania danych dyfrakcyjnych dla obu struktur, a ich statystyka została przedstawiona w Tabelach 13 i 14. Struktury zostały rozwiązane metodą podstawienia cząsteczkowego z użyciem programu Phaser (McCoy *i in.*, 2007). Do rozwiązania struktury obu kompleksów wykorzystano model Z-DNA o kodzie PDB 1i0t (Tereshko *i in.*, 2003).

**Tabela 14.** Statystyka zbioru danych dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ .

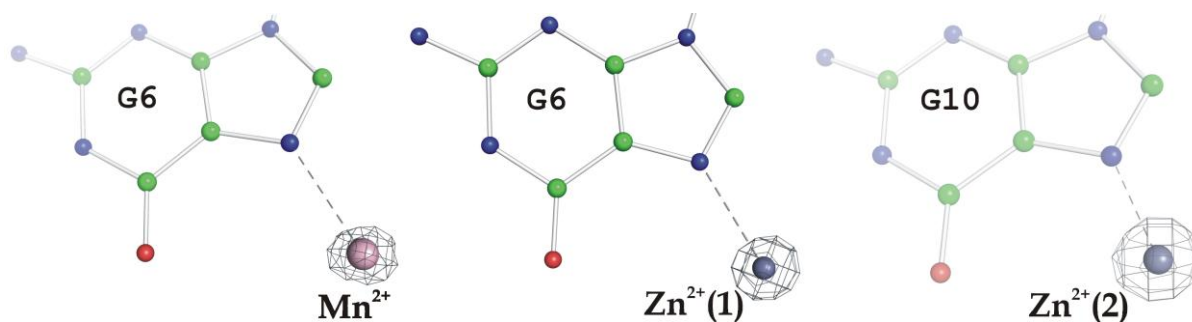
Rozdzielczość (Å)	Liczba refleksów		Kompletność (%)	$R_{\text{merge}}$ (%)	$\langle I/\sigma I \rangle$	$R_{\text{meas}}^{(a)}$ (%)	Anomal Corr <sup>(b)</sup> (%)
	zaobserwowanych	niezależnych					
2,54	5403	1529	98,4	4,0	38,75	4,8	83
1,80	10339	2778	98,3	2,7	37,60	3,1	85
1,47	13169	3536	97,4	2,9	34,16	3,4	83
1,27	15491	4165	96,7	3,4	30,50	4,0	79
1,14	17642	4725	95,8	4,3	25,84	5,1	74
1,04	18938	5112	94,7	6,0	19,56	7,00	62
0,96	11973	5246	90,2	7,6	10,72	9,9	49
0,90	9585	5149	80,9	12,2	5,44	17,2	24
0,85	7595	4279	63,8	22,2	3,11	31,4	2
<b>Cały zakres</b>	<b>110135</b>	<b>36519</b>	<b>87,9</b>	<b>3,6</b>	<b>20,02</b>	<b>4,3</b>	<b>68</b>

<sup>(a)</sup> Wskaźnik rozbieżności  $R$  niezależny od krotności (Kabsch, 2010).

<sup>(b)</sup> Współczynnik korelacji pomiędzy różnicami anomalnymi w dwóch podzbiorach otrzymanych przez przypadkowy podziału zbioru wszystkich refleksów

W początkowych etapach modele udokładniania za pomocą programu *REFMAC5* (Murshudov *i in.*, 2011) z pakietu *CCP4* (Winn *i in.*, 2011). Następnie zastosowano program *SHELXL* do udokładniania anizotropowego (Scheldrick, 2008). Przy długościach fali użytych w eksperymentach wartość poprawki urojonej ( $f''$ ) czynnika rozpraszania anomalnego dla atomów Mn i Zn wynosi odpowiednio 0,909/1,163 i 1,827 jednostki elektronowej (Cromer, 1983). Z tej przyczyny, udokładnianie obu struktur przeprowadzono przy rozdzielonych parach Bijvoet. Decyzja ta była także podyktowana wyraźnie widocznym w danych dyfrakcyjnych sygnałem anomalnym, co ilustrują, ostatnie kolumny Tabeli 13 i 14. Po każdym 50 cyklach minimalizacji metodą *CGLS* (ang. *conjugate-gradient least-squares*), używano programu *Coot* (Emsley *i in.*, 2010) do wizualizacji map gęstości elektronowej i przebudowy modeli. Atomy wodoru dodawano do modeli z więzami geometrycznymi (ang. *riding position*) i udokładniano izotropowo. Instrukcja *AFIX\_87* została użyta do udokładniania grup hydroksylowych DNA. Nie podejmowano prób modelowania atomów wodoru w cząsteczkach wody. Ocena postępów udokładniania modeli była prowadzona z użyciem wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{\text{free}}$  oraz programu *NuCheck* (Feng *i in.*, 1998). Zbiory 1009 (2,11%) i 1004 (2,75%) przypadkowo wybranych refleksów zostały wykorzystane do obliczania wskaźnika  $R_{\text{free}}$  odpowiednio dla kompleksu z jonami  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . W końcowym cyklu udokładniania refleksy  $R_{\text{free}}$  zostały

włączone do ogólnej puli refleksów. Więzy stereochemiczne (takie jak długości wiązań i kąty walencyjne) dla cząsteczki DNA (kompleks z  $\text{Zn}^{2+}$ ) zastosowano tylko dla nukleotydów w podwójnej konformacji. Wzięto je z prac Clowney *i in.* (1996), Gelbin *i in.* (1996) i Parkinson *i in.* (1996). Kąty i długości wiązań dla kationu sperminy<sup>4+</sup> wygenerowano z informacji o odległościach międzyatomowych w *Międzynarodowych Tablicach Krystalograficznych* (Allen *i in.*, 2006). Wagi więzów stereochemicznych ustalone przez instrukcję DEFS były następujące: 0,015 0,075 0,01 0,03 (kompleks z  $\text{Mn}^{2+}$ ) i 0,02 0,1 0,01 0,04 (kompleks z  $\text{Zn}^{2+}$ ). Instrukcje ISOR, SIMU i DELU z programu *SHELXL* zastosowano tylko dla kationów sperminy<sup>4+</sup> i cząsteczek wody w obu strukturach (Müller *i in.*, 2006). W celu wyznaczenia odchyleń standardowych dla wszystkich indywidualnie udokładnianych parametrów i wszystkich parametrów geometrycznych, obliczono jeden cykl pełnomacierzowego udokładniania metodą najmniejszych kwadratów, w którym uwzględniono wszystkie refleksy oraz wyłączono wszystkie więzy stereochemiczne. Łańcuch DNA dla nukleotydów G2 i G3–G4 dla struktury  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  wymodelowano w dwóch konformacjach oznaczonych jako I (obsadzenia 61 i 57%) i II (39, 43%). Cząsteczki wody dodano do modeli w oparciu o różnicową mapę gęstości elektronowej *Fo–Fc*, uwzględniając geometrię rozpatrywanego fragmentu komórki elementarnej. Za granicę oddziaływań donor–akceptor w wiązaniach wodorowych przyjęto odległość 3,50 Å. Dotyczy to wszystkich analizowanych w tej pracy struktur. Cząsteczki wody udokładniano anizotropowo bez więzów pozycyjnych (ang. *positional restraints*) wraz z czynnikami obsadzenia. Ułamkowe współczynniki obsadzenia (w granicach 0,2–0,93) przypisano 35 cząsteczkom wody w analizowanych strukturach z  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . W sytuacji gdy udokładniony współczynnik obsadzenia dla cząsteczki wody był większy od 0,93, wartość tą zaokrąglono i ustalono jako 1,0.



**Rys. 28.** Anomalna mapa różnicowa dla kationów metali w kompleksach  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  (kontur 10,0 $\sigma$ ).

Bliskie pary cząsteczek wody (odległość  $< 2,3 \text{ \AA}$ ) miały sumaryczną wartość obsadzenia ustaloną na 1,0. Położenia kationów  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}(1)$  i  $\text{Zn}^{2+}(2)$  na mapie  $2Fo-Fc$  były zbieżne z obrazem anomalnej mapy różnicowej (32,3, 58,0 i 57,0 $\sigma$ ; Rys. 28). Parametry helikalne helis Z-DNA obliczono za pomocą programu *3DNA* (Lu & Olson, 2003), a kąty pseudorotacji ( $P$ ) wyznaczono według metody Jaskólskiego (1984). Rysunki wykonano z użyciem programu *PyMOL* (DeLano, 2002).

#### IV.4.2 Kompleks $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$

Dane dyfrakcyjne dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  zmierzono z rozdzielczością 0,71  $\text{\AA}$  na linii 14.2 ośrodka BESSY w Berlinie (Tabela 15). Kryształ w czasie pomiaru znajdował się w strumieniu par azotu (100 K). Roztwór rezerwuarowy posłużył jako krioprotektant. Kompletny zestaw danych dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  zmierzono używając jednego kryształu. Zarejestrowano dwa zbiory danych o różnym czasie naświetlania i odległości od detektora, w celu poprawnego zmierzenia zarówno słabych jak i silnych refleksów oraz dla uniknięcia nasycenia detektora MAR225. Zbiory rejestrowano z kątem oscylacji  $1^\circ$  w odległości kryształ–detektor odpowiednio: 160 i 45 mm, do rozdzielczości: 1,21 i 0,71  $\text{\AA}$  z liczbą obrazów 100, 150. Pakiet *XDS* (Kabsch, 2010) wykorzystano do wskaźnikowania, integracji i skalowania danych dyfrakcyjnych, a statystyka połączonych zbiorów danych została przedstawiona w Tabeli 16. Analiza części asymetrycznej komórki elementarnej przy pomocy współczynnika Matthews (Matthews, 1968) wskazała na obecność jednej cząsteczki dupleksu przy zawartości cząsteczek 28,3% rozpuszczalnika. Struktura została rozwiązana metodą podstawienia cząsteczkowego z użyciem programu *Phaser* (McCoy *i in.*, 2007). Jako model posłużył dupleks Z-DNA o kodzie PDB 3p4j (Brzeziński *i in.*, 2011).

W początkowych etapach model udokładniano za pomocą programu *REFMAC5* (Murshudov *i in.*, 2011) z pakietu *CCP4* (Winn *i in.*, 2011). Następnie zastosowano program *SHELXL* do udokładniania anizotropowego (Scheldrick, 2008). Udokładnianie struktury przeprowadzono przy rozdzielonych parach Bijvoet. Po każdym 50 cyklach minimalizacji metodą *CGLS* (ang. *conjugate-gradient least-squares*), używano programu *Coot* (Emsley *i in.*, 2010) do wizualizacji map gęstości elektronowej i przebudowy modelu. Atomy wodoru dodawano do modelu z więzami geometrycznymi i udokładniano izotropowo. Instrukcja *AFIX\_87* została użyta do udokładniania grup hydroksylowych DNA. Nie podejmowano prób modelowania atomów wodoru w cząsteczkach wody.

**Tabela 15.** Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ .

Kompleks	$d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$
Źródło promieniowania	14.2 BESSY Berlin
Długość fali (Å)	0,8265
Temperatura (K)	100
Grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$
Parametry komórki (Å)	$a = 18,01, b = 31,03, c = 43,93$
Zakres rozdzielczości (Å)	$25,57 - 0,71$ ( $0,73 - 0,71$ ) <sup>(a)</sup>
Efektywna rozdzielczość <sup>(b)</sup> (Å)	0,74
Liczba refleksów	35176 <sup>(c)</sup>
Kompletność (%)	92,6 (39,4)
Krotność obserwacji	3,36 (1,58)
$\langle I/\sigma I \rangle$	26,86 (8,74)
$R_{\text{merge}}$ <sup>(d)</sup> (%)	3,5 (5,9)
Wilson B-faktor (Å <sup>2</sup> )	4,87
<b>Udokładnianie</b>	
Program	<i>SHELXL</i>
Rozdzielczość (Å)	$25,57 - 0,71$
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu	62129 <sup>(e)</sup>
Liczba refleksów testowych	1007
$R/R_{\text{free}}$ <sup>(f)</sup> (%)	9,01/9,43
Liczba atomów (DNA/H <sub>2</sub> O/K <sup>+</sup> )	240/110/1
$\langle B_{\text{eq}} \rangle$ (Å <sup>2</sup> ) (łańcuch DNA: A/B/ H <sub>2</sub> O/Put <sup>2+</sup> /K <sup>+</sup> )	5,83/4,77/5,97/6,94/10,79
Odchylenie r.m.s.d od wartości idealnej długości wiązań (Å)	0,012
kątów (°)	0,022

<sup>(a)</sup> Wartości w nawiasach dotyczą ostatniej powłoki rozdzielczości

<sup>(b)</sup> Rozdzielczość przy hipotetycznej wartości 100% kompletności zbioru danych, obliczona programem *DATAMAN* (Kleywegt & Jones, 1996).

<sup>(c)</sup> Pary Bijvoet uśrednione.

<sup>(d)</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_j |I_j - \langle I \rangle| / \sum_h \sum_j I_j$ , gdzie  $I_j$  jest intensywnością obserwacji refleksu  $j$ .

<sup>(e)</sup> Pary Bijvoet rozdzielone.

<sup>(f)</sup>  $R = \sum_h | |F_o| | - |F_c| | / \sum_h |F_o|$  dla wszystkich refleksów, gdzie  $F_o$  i  $F_c$  są odpowiednio obserwowanymi i obliczonymi czynnikami struktury.  $R_{\text{free}}$  jest obliczone z użyciem refleksów testowych wyłączonych z udokładniania.

Ocena postępów udokładniania modeli była prowadzona z użyciem wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{\text{free}}$  oraz programu *NuCheck* (Feng i in., 1998). Zbior 1007 (2,86%) przypadkowo wybranych refleksów został wykorzystany do obliczania wskaźnika  $R_{\text{free}}$ . W końcowym cyklu udokładniania refleksy  $R_{\text{free}}$  zostały włączone do ogólnej puli refleksów.



**Tabela 16.** Statystyka dwóch połączonych zbiorów danych dla kryształu kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ .

Rozdzielczość (Å)	Liczba refleksów		Kompletność (%)	$R_{\text{merge}}$ (%)	$\langle I/\sigma I \rangle$	$R_{\text{meas}}^{(a)}$ (%)	Anomal Corr <sup>(b)</sup> (%)
	zaobserwowanych	niezależnych					
3,18	1840	493	99,6	3,0	47,48	3,6	-8
2,25	4379	827	99,6	4,0	52,62	4,5	-7
1,83	6650	1054	99,8	4,2	55,03	4,6	2
1,59	8266	1236	99,9	3,6	52,93	4,0	13
1,42	9627	1384	99,9	3,3	49,13	3,6	21
1,30	9023	1506	100,0	3,2	43,30	3,5	11
1,20	7062	1624	99,6	2,9	36,43	3,2	11
1,12	5314	1740	99,3	2,5	32,71	3,0	5
1,06	5535	1830	98,7	2,7	31,22	3,2	4
1,00	5836	1956	99,0	2,8	29,31	3,4	7
0,96	6057	2057	99,5	2,7	27,38	3,3	9
0,92	6155	2119	99,8	3,0	24,73	3,7	4
0,88	6326	2237	99,5	3,2	22,54	4,0	9
0,85	6343	2305	99,4	3,6	20,70	4,5	13
0,82	6216	2361	99,5	4,0	18,69	5,1	-2
0,79	6386	2486	99,1	4,7	16,36	6,0	4
0,77	5981	2441	95,8	5,4	14,67	6,9	3
0,75	5677	2386	91,1	6,1	13,28	7,7	0
0,73	3857	2048	75,8	6,4	10,73	8,3	-9
0,71	1632	1086	39,4	5,9	8,74	7,5	10
<b>Cały zakres</b>	<b>118162</b>	<b>35176</b>	<b>92,6</b>	<b>3,5</b>	<b>26,86</b>	<b>4,0</b>	<b>6</b>

<sup>(a)</sup> Wskaźnik rozbieżności  $R$  niezależny od krotności (Kabsch, 2010).

<sup>(b)</sup> Współczynnik korelacji pomiędzy różnicami anomalnymi w dwóch podzbiorach otrzymanych przez przypadkowy podziału zbioru wszystkich refleksów

Więzy stereochemiczne (takie jak długości wiązań i kąty walencyjne) dla cząsteczki DNA zastosowano tylko dla nukleotydów w podwójnej konformacji. Wzięto je z prac Clowney *i in.* (1996), Gelbin *i in.* (1996) i Parkinson *i in.* (1996). Kąty i długości wiązań dla kationu putrescyny<sup>2+</sup> wygenerowano z informacji o odległościach międzyatomowych w *Międzynarodowych Tablicach Krystalograficznych* (Allen *i in.*, 2006). Wagi więzów stereochemicznych ustalone przez instrukcję DEFS były następujące: 0,02 0,1 0,01 0,04. Instrukcje ISOR, SIMU i DELU z programu *SHELXL* zastosowano tylko dla kationów putrescyny<sup>2+</sup> i cząsteczek wody (Müller *i in.*, 2006). W celu wyznaczenia odchyłeń standardowych dla wszystkich indywidualnie udokładnianych parametrów i wszystkich parametrów geometrycznych, obliczono jeden cykl pełnomacierzowego udokładniania metodą najmniejszych kwadratów, w którym uwzględniono wszystkie refleksy oraz wyłączono wszystkie więzy stereochemiczne. Łańcuch DNA dla nukleotydów C3–G4, G4–C5 i C5–G6 dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  wymodelowano w dwóch konformacjach oznaczonych jako I

(obsadzenia 53, 32 i 53%) i II (47, 68 i 47%). Cząsteczki wody dodano do modeli w oparciu o różnicową mapę gęstości elektronowej  $F_o - F_c$ , uwzględniając względy stereochemiczne. Cząsteczki wody udokładniano anizotropowo bez więzów pozycyjnych wraz z czynnikami obsadzenia. Ułamkowe współczynniki obsadzenia (w granicach 0,2–0,93) przypisano 92 cząsteczkom wody. W sytuacji gdy udokładniony współczynnik obsadzenia dla cząsteczki wody był większy od 0,93, wartość tę zaokrąglono i ustalono jako 1,0. Sumaryczna wartość obsadzeń bliskich par cząsteczek wody (odległość  $< 2,3 \text{ \AA}$ ) wynosiła 1,0. Do wizualizacji map gęstości elektronowej i przebudowy modelu używano programu *Coot* (Emsley *i in.*, 2010). Ocenę postępów udokładniania modelu prowadzono z użyciem wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{\text{free}}$  oraz programu *NuCheck* (Feng *i in.*, 1998). Parametry helikalne helisy Z-DNA obliczono za pomocą programu *3DNA* (Lu & Olson, 2003), a kąty pseudorotacji ( $P$ ) wyznaczono według metody Jaskólskiego (1984). Rysunki wykonano z użyciem programu *PyMOL* (DeLano, 2002).

#### IV.4.3 Kompleks $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$

Dane dyfrakcyjne dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  zebrano z rozdzielczością  $1,0 \text{ \AA}$  na linii 14.2 ośrodka BESSY w Berlinie (Tabela 17). Kryształ w czasie pomiaru znajdował się w strumieniu par azotu ( $100 \text{ K}$ ). Roztwór rezerwuarowy posłużył jako krioprotektant. Kompletny zestaw danych zmierzono używając jednego kryształu. Zarejestrowano cztery zbiory danych z wykorzystaniem różnych czasów pomiaru i odległości od detektora, w celu poprawnego zmierzenia zarówno silnych jak i słabych refleksów oraz dla uniknięcia nasycenia detektora MAR225. Zbiory rejestrowano z kątem oscylacji  $1^\circ$  w odległości kryształ–detektor odpowiednio: 350, 250, 140 i  $70 \text{ mm}$ , do rozdzielczości: 2,97, 2,20, 1,39 i  $1,0 \text{ \AA}$  z liczbą obrazów 100, 100, 110, 110. Pakiet *XDS* (Kabsch, 2010) wykorzystano do wskaźnikowania, integracji i skalowania danych dyfrakcyjnych, a statystyka połączonych zbiorów danych została przedstawiona w Tabeli 18.

**Tabela 17.** Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ .

Kompleks	$d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$
Zródło promieniowania	14.2 BESSY Berlin
Długość fali (Å)	0,9184
Temperatura (K)	100
Grupa przestrzenna	$P2_12_12_1$
Parametry komórki (Å)	$a = 18,13, b = 30,43, c = 42,92$
Rozdzielczość (Å)	$25,57 - 1,00 (0,81 - 1,00)^{(a)}$
Liczba niezależnych refleksów	$24599^{(b)}$
Kompletność (%)	99,1 (99,7)
Krotność obserwacji	3,34 (2,15)
$\langle I/\sigma I \rangle$	27,84 (2,20)
$R_{\text{merge}}^{(c)}$ (%)	2,3 (41,2)
Wilson B-faktor (Å <sup>2</sup> )	4,87
<b>Udokładnianie</b>	
Program	<i>REFMAC5</i>
Rozdzielczość (Å)	$24,82 - 1,00$
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu	$12353^5$
Liczba refleksów testowych	1002
$R/R_{\text{free}}^{(e)}$ (%)	15,82/18,74
Liczba atomów (DNA/H <sub>2</sub> O/Cr <sup>3+</sup> )	240/59/3
$\langle B \rangle$ (Å <sup>2</sup> )	15,13/12,42/24,80/12,40
(łańcuch DNA: A/B DNA/H <sub>2</sub> O/Cr <sup>3+</sup> )	
Odchylenie r.m.s.d od wartości idealnej	0,020
długości wiązań (Å)	
kątów (°)	2,18

<sup>(a)</sup> Wartości w nawiasach dotyczą ostatniej powłoki rozdzielczości.

<sup>(b)</sup> Pary Bijvoet rozdzielone.

<sup>(c)</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_j |I_j - \langle I \rangle| / \sum_h \sum_j I_j$ , gdzie  $I_j$  jest intensywnością obserwacji refleksu  $j$ .

<sup>(d)</sup> Pary Bijvoet uśrednione.

<sup>(e)</sup>  $R = \sum_h \left| |F_o| - |F_c| \right| / \sum_h |F_o|$  dla wszystkich refleksów, gdzie  $F_o$  i  $F_c$  są odpowiednio obserwowanymi i obliczonymi czynnikami struktury.  $R_{\text{free}}$  jest obliczone z użyciem refleksów testowych wyłączonych z udokładniania.

Analiza części asymetrycznej komórki elementarnej przy pomocy współczynnika Matthews (Matthews, 1968) wskazała na obecność jednej cząsteczki dupleksu przy zawartości cząsteczek 25,7% rozpuszczalnika. Struktura została rozwiązana metodą podstawienia cząsteczkowego z użyciem programu *Phaser* (McCoy *i in.*, 2007), a jako model wykorzystano dupleks Z-DNA o kodzie PDB 3p4j (Brzeziński *i in.*, 2011). Model udokładniano anizotropowo za pomocą programu *REFMAC5* (Murshudov *i in.*, 2011) z pakietu *CCP4* (Winn *i in.*, 2011). Do wizualizacji map gęstości elektronowej i przebudowy modeli używano programu *Coot* (Emsley *i in.*, 2010).

**Tabela 18.** Statystyka dwóch połączonych zbiorów danych dyfrakcyjnych dla kryształu kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ .

Rozdzielczość (Å)	Liczba refleksów		Kompletność (%)	$R_{\text{merge}}$ (%)	$\langle I/\sigma I \rangle$	$R\text{-meas}^{(a)}$ (%)	Anomal Corr <sup>(b)</sup> (%)
	zaobserwowanych	niezależnych					
4,47	1997	272	99,3	2,3	110,30	2,5	73
3,16	4238	512	100,0	2,3	113,90	2,5	71
2,58	4559	644	99,7	1,9	97,63	2,1	69
2,24	5280	782	100,0	1,7	90,73	1,8	75
2,00	4236	874	99,3	1,5	70,19	1,7	68
1,83	4534	972	99,5	1,7	63,54	1,9	61
1,69	4800	1039	99,5	1,9	55,23	2,1	45
1,58	5406	1179	99,9	2,3	47,89	2,6	40
1,49	5419	1195	99,8	3,2	38,69	3,7	31
1,41	5819	1281	99,9	4,5	29,35	5,1	22
1,35	3873	1338	99,6	5,2	20,42	6,2	15
1,29	3168	1393	99,4	5,1	16,59	6,6	6
1,24	3330	1486	99,4	6,1	13,69	7,9	9
1,20	3373	1499	99,5	8,1	10,68	10,4	8
1,15	3505	1584	99,2	8,4	10,18	10,9	9
1,12	3580	1614	99,5	11,6	7,70	15,0	11
1,08	3717	1703	99,0	14,9	5,76	19,3	10
1,05	3731	1705	98,5	21,4	4,27	27,7	-1
1,03	3787	1754	97,2	27,7	3,22	36,1	-3
1,00	3808	1773	97,4	41,2	2,20	53,5	5
<b>Cały zakres</b>	<b>82160</b>	<b>24599</b>	<b>99,1</b>	<b>2,3</b>	<b>27,84</b>	<b>2,5</b>	<b>18</b>

<sup>(a)</sup> Wskaźnik rozbieżności  $R$  niezależny od krotności (Kabsch, 2010).

<sup>(b)</sup> Współczynnik korelacji pomiędzy różnicami anomalnymi w dwóch podzbiorach otrzymanych przez przypadkowy podziału zbioru wszystkich refleksów

Ocenę postępów udokładniania modelu prowadzono z użyciem wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{\text{free}}$  oraz programu *NuCheck* (Feng *i in.*, 1998). Zbiór 1002 (7,5%) przypadkowo wybranych refleksów wykorzystano do obliczeń  $R_{\text{free}}$ . Łańcuch DNA dla nukleotydów G2–C9 oraz G10–C11 w strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  został wymodelowany w dwóch konformacjach oznaczonych jako I oraz II ze współczynnikiem obsadzenia po 0,5. Cząsteczki wody dodawano do modelu w oparciu o różnicową mapę gęstości elektronowej  $F_o - F_c$  i uwzględniając względy stereochemiczne. Sumaryczna wartość obsadzeń bliskich par cząsteczek wody (odległość  $< 2,3$  Å) wynosiła 1,0. Parametry helikalne helisy  $d(\text{CGCGCG})_2$  obliczono za pomocą programu *3DNA* (Lu & Olson, 2003), a rysunki wykonano z użyciem programu *PyMOL* (DeLano, 2002).

#### IV.4.4 Komplex RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>

Dane dyfrakcyjne dla kompleksu RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> zmierzono z rozdzielczością 1,6 Å na linii X13 EMBL synchrotronu ośrodka DESY w Hamburgu. Zarejestrowano 120 obrazów z oscylacją 1°. Roztwór macierzysty posłużył jako krioprotektant. Wskaźnikowanie, integrację i skalowanie wykonano za pomocą pakietu *HKL–2000* (Otwinowski & Minor, 1997). Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształów hybrydy RNA:DNA podsumowane są w Tabeli 19 i 20. Analiza części asymetrycznej komórki elementarnej przy pomocy współczynnika Matthews (Matthews, 1968) wskazała na obecność jednej cząsteczki RNA:DNA przy zawartości rozpuszczalnika na poziomie 36,7%. Strukturę rozwiązano za pomocą podstawienia cząsteczkowego używając programu *Phaser* (McCoy *i in.*, 2007). Jako model wykorzystano dekamer RNA:DNA o kodzie PDB 1pjo (Kopka *i in.*, 2003). Brakujące w modelu pary zasad zostały dodane w programie *Coot* (Emsley *i in.*, 2010).

**Tabela 19.** Statystyka zbioru danych dyfrakcyjnych dla kryształu kompleksu RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>.

Rozdzielczość (Å)	Liczba refleksów niezależnych	Kompletność (%)	$R_{\text{int}}^{(a)}$ (%)	$R$ (%)	$\langle I/\sigma I \rangle$	$\chi^2^{(b)}$	Krotność obserwacji
3,45	854	97,9	2,8	3,7	54,09	1,073	3,9
2,74	816	99,7	2,8	3,1	54,11	0,990	3,9
2,39	818	99,7	4,7	4,6	39,40	1,070	3,8
2,17	802	99,9	7,0	6,3	26,61	0,985	3,7
2,02	786	99,9	8,9	8,1	23,57	1,101	3,7
1,90	785	100,0	14,4	15,5	15,09	1,088	3,7
1,80	798	100,0	19,2	17,1	11,23	1,081	3,7
1,72	780	99,9	26,1	22,8	8,35	1,054	3,6
1,66	785	100,0	36,2	29,7	5,77	1,074	3,5
1,60	788	99,6	55,0	41,1	2,85	0,948	3,0
<b>Cały zakres</b>	<b>8012</b>	<b>99,5</b>	<b>4,0</b>	<b>3,7</b>	<b>41,70</b>	<b>1,048</b>	<b>3,6</b>

<sup>(a)</sup>  $R_{\text{int}} = \sum_h \sum_j |I_{hj} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{hj}$ , gdzie  $I_{hj}$  jest intensywnością obserwacji  $j$  refleksu  $h$ .

<sup>(b)</sup>  $\chi^2 = [\sum (I_{hj} - \langle I_h \rangle)^2] / [(\sigma^2 \cdot N/N-1)]$ , gdzie  $N$  jest krotnością pomiaru.

Udokładnianie prowadzono z użyciem programu *REFMAC5* (Murshudov *i in.*, 2011) z pakietu *CCP4* (Winn *i in.*, 2011). Do obliczeń  $R_{\text{free}}$  (Brünger, 1992) z całej liczby refleksów wyodrębniono zbiór 790 (10,0%) przypadkowych refleksów. Do wizualizacji mapy gęstości elektronowej i przebudowy modelu posłużył program *Coot*. Model udokładniano uwzględniając izotropowe czynniki temperaturowe ( $B_{\text{iso}}$ ), a także parametry TLS (ang. *translation, libration, screw motion*; sześć grup TLS: każdy łańcuch hybrydy podzielono na trzy fragmenty, Painter & Merritt, 2006).

Analiza mapy gęstości elektronowej hybrydy RNA:DNA wskazywała na nieuporządkowanie dwóch segmentów łańcucha RNA (u1–a2 i g6–a8), które wymodelowano w podwójnych konformacjach (oznaczone jako I i II) ze współczynnikiem obsadzenia odpowiednio 60% i 40%.

**Tabela 20.** Dane krystalograficzne oraz charakterystyka zbioru danych dla struktury RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>.

RNA:DNA–Mg <sup>2+</sup>	
Źródło promieniowania	X13, DESY, Hamburg
Długość fali (Å)	0,8010
Temperatura (K)	100
Grupa przestrzenna	<i>P</i> 3 <sub>2</sub> 21
Parametry komórki (Å)	a = 41,9, c = 57,2
Rozdzielczość (Å)	50,0 – 1,60 (1,66 – 1,60) <sup>(a)</sup>
Liczba niezależnych refleksów	8012
Kompletność (%)	99,5 (99,6)
Krotność obserwacji	6,7 (5,5)
$\langle I/\sigma I \rangle$	41,7 (2,85)
$R_{\text{int}}$ (%) <sup>(b)</sup>	4,0 (55,0)
Udokładnianie	
Program	<i>REFMAC5</i>
Rozdzielczość (Å)	15,32 - 1,60
Liczba refleksów użytych w udokładnianiu	7204
Liczba refleksów testowych	790
$R/R_{\text{free}}$ (%) <sup>(c)</sup>	18,1/22,9
Liczba atomów (RNA:DNA/H <sub>2</sub> O/Mg <sup>2+</sup> )	497/ 76/ 3
$\langle B_{\text{iso}} \rangle$ (Å <sup>2</sup> ) (łańcuch: A/B/ H <sub>2</sub> O/Mg <sup>2+</sup> )	28,7/27,0/37,1/23,3
Odchylenie r.m.s.d od wartości idealnej	
długości wiązań (Å)	0,020
kątów (°)	2,26

<sup>(a)</sup> Wartości w nawiasach dotyczą ostatniego przedziału rozdzielczości.

<sup>(b)</sup>  $R_{\text{int}} = \sum_h \sum_j |I_{hj} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_j I_{hj}$ , gdzie  $I_{hj}$  jest intensywnością obserwacji  $j$  refleksu  $h$ .

<sup>(c)</sup>  $R = \sum_h | |F_o| | - |F_c| | / \sum_h |F_o|$  dla wszystkich refleksów, gdzie  $F_o$  i  $F_c$  są obserwowanymi i obliczonymi czynnikami struktury.  $R_{\text{free}}$  jest obliczone z użyciem refleksów testowych nie włączonych do udokładniania.

## V Wyniki i dyskusja

### V.1 Wyniki badań nad kompleksami $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ oraz $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$

#### V.1.1 Jakość wyników

Wyznaczone w ramach tej pracy struktury kompleksów z jonami  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  udokładniono z użyciem danych dyfrakcyjnych o rozdzielczości odpowiednio 0,75 i 0,85 Å do końcowego  $R$  wynoszącego 7,09 i 9,22%. Wyniki te (szczególnie dla kompleksu z  $\text{Mn}^{2+}$ ) mogą być porównane w odniesieniu do dokładności z modelem Z-DNA opisanym przez Brzezińskiego *i in.* (2011) (0,55 Å,  $R = 7,77\%$ , kod PDB 3p4j). Wartości r.m.s.d. (średnie kwadratowe odchylenie) dla nukleotydów DNA pomiędzy strukturą 3p4j, a przedstawionymi w tej rozprawie kompleksami z  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  wynoszą odpowiednio 0,146, 0,289 Å [konformacja I dla  $d(\text{CGCGCG})_2$  z  $\text{Zn}^{2+}$ ] i 0,390 Å [konformacja II dla  $d(\text{CGCGCG})_2$  z  $\text{Zn}^{2+}$ ]. Wyznaczone odchylenia standardowe (ang. *estimated standard uncertainties; e.s.u.*) dla całkowicie obsadzonych pozycji atomów DNA dla struktury z  $\text{Mn}^{2+}$  zawierają się w przedziale 0,006 – 0,012 Å dla atomów C, 0,005 – 0,008 Å dla atomów N, 0,004 – 0,019 Å dla atomów O i 0,002 – 0,004 dla atomów P. Wartości *e.s.u.* dla struktury z  $\text{Zn}^{2+}$  są większe i wynoszą 0,011 – 0,028 Å dla atomów C, 0,009 – 0,015 Å dla atomów N, 0,008 – 0,023 Å dla atomów O i 0,004 – 0,007 dla atomów P. Zgodnie z oczekiwaniami odchylenia dla pozycji kationów metali są niższe: 0,001 Å dla  $\text{Mn}^{2+}$  i 0,001 – 0,002 Å dla  $\text{Zn}^{2+}$ .

#### V.1.2 Ogólna struktura i parametry helikalne

Część asymetryczna komórki elementarnej w obu przypadkach zawiera duplekсы DNA mające numerację nukleotydów zgodną ze strukturami tego typu wcześniej zdeponowanymi w bazie PDB. Ogólne parametry strukturalne helis DNA z kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  pozwalają zaliczyć je do rodziny helis Z-DNA. Porównanie parametrów helikalnych i geometrii par zasad pomiędzy omawianymi tutaj kompleksami z  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , a wcześniej opisanymi innymi kompleksami Z-DNA z kationami metali i poliaminami<sup>n+</sup>, zawarte jest w Tabeli 21. Wartości r.m.s.d dotyczące pozycji atomów pomiędzy dupleksami wynoszą 0,316 Å, kiedy porównujemy  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  do  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  z konformacją I łańcucha DNA i 0,431 Å dla konformacji II. Pomimo ogólnego

podobieństwa tych dwóch kompleksów, znaczące różnice obserwowane są dla konformacji szkieletu cukrowo-fosforanowego DNA (Tabela 22 i 23).

**Tabela 21.** Średnie wartości wybranych parametrów helikalnych dla struktur Z-DNA. Dla wielu nazw parametrów helikalnych brak jest odpowiedników w polskiej literaturze naukowej (por. Rys. 12).

	Helical twist $\Omega_h (^{\circ})$	Helical rise (Å)	Inclination $\eta (^{\circ})$	Tip ( $^{\circ}$ )	Tilt ( $^{\circ}$ )	Roll ( $^{\circ}$ )	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm <sup>4+</sup> -Mn <sup>2+</sup> (PDB 4hig) <b>ta praca</b>	-58,99	4,50	17,45	5,23	0,71	-3,10	-0,07	2,79	3,45
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm <sup>4+</sup> -Zn <sup>2+</sup> (PDB 4hif) <b>ta praca</b>	-60,93	4,11	15,64	0,47	-0,03	-2,45	-0,14	2,87	3,52
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Put <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> <b>ta praca</b>	-60,19	4,35	14,27	2,81	0,48	-3,32	-0,03	2,77	3,46
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Cr <sup>3+</sup> <b>ta praca</b> <sup>(a)</sup>	-60,46 -60,85	3,66 3,65	4,13 3,30	0,47 -1,49	-0,31 -0,38	-1,59 -1,39	-0,03	3,03 3,05	3,51 3,52
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm-Mg <sup>2+</sup> (PDB 1ick)	-59,89	4,41	15,00	3,23	0,51	-3,14	-0,02	2,80	3,49
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm-Mg <sup>2+</sup> (PDB 2dcg)	-59,81	4,29	12,81	1,61	0,32	-3,14	-0,03	2,81	3,49
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Mg <sup>2+</sup> (PDB 1dcg)	-60,28	4,48	13,92	0,10	0,02	-2,77	0,01	2,84	3,55
d(CACGCG):d(CGCGTG)-Mn <sup>2+</sup> (PDB 3fq5) <sup>(b)</sup>	-58,72 -60,10	3,99 3,94	11,45 7,94	-12,58 -12,42	-0,76 -0,81	-1,46 -1,85	-0,02 -0,03	2,77 2,91	3,62 3,69
d(CACGCG):d(CGCGTG)-Mn <sup>2+</sup> (PDB 4dwy) <sup>(b)</sup>	-57,75 -59,34	3,64 4,08	3,64 18,94	-1,38 -8,19	-0,81 0,08	-1,52 -1,78	-0,04 0,03	2,82 3,00	3,54 3,63
d(CACGCG):d(CGCGTG)-Mn <sup>2+</sup> (PDB 4dy8)	-62,37	2,90	2,38	-14,51	-0,23	-2,01	-0,20	2,89	3,48
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Cu <sup>2+</sup> (PDB 1d39)	-60,45	4,08	8,48	-1,48	0,04	-2,67	0,02	2,85	3,55
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm (PDB 3p4j)	-59,97	4,28	14,14	4,17	0,66	-3,23	0,00	2,78	3,45
d(CGCGCG) <sub>2</sub> -Spm (PDB 1i0t)	-61,36	3,35	2,05	4,62	1,01	-1,62	-0,02	3,04	3,47

<sup>(a)</sup> Górne/dolne wartości odnoszą się do konformacji I i II nici DNA w kompleksie z Cr<sup>3+</sup>.

<sup>(b)</sup> Górne/dolne wartości odnoszą się do dwóch dupleksów w części asymetrycznej (Mandal *i in.*, 2012).



**Tabela 22.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo–fosforanowego dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ . Odchylenia standardowe podane są w nawiasach. Wszystkie wartości numeryczne w tabeli podano w stopniach. Amplitudy pofałdowania pierścienia furanozy ( $\tau_m$ ), kąty fazowe pseudorotacji ( $P$ ) jak ich odchylenia (wartości w nawiasach) od idealnego modelu (cyclopentanu) zostały obliczone za pomocą metody Jaskólskiego (1984). Definicje kątów torsyjnych (por. Rys. 4) :  $\alpha$ : O3'(i-1)-P-O5'-C5'  $\beta$ : P-O5'-C5'-C4',  $\gamma$ : O5'-C5'-C4'-C3',  $\delta$ : C5'-C4'-C3'-O3',  $\varepsilon$ : C4'-C3'-O3'-P(i+1),  $\zeta$ : C3'-O3'-P(i+1)-O5'(i+1),  $\chi$ : O4'-C1'-N1-C2 (pirymidyny), O4'-C1'-N9-C4 (puryny).

$d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$												
Kąt	C1	C3	C5	C7	C9	C11	G2	G4	G6	G8	G10	G12
$\alpha$	-	-148,8(5)	168,0(3)	-	-140,4(3)	-141,2(5)	62,9(4)	69,0(4)	74,9(3)	61,9(3)	64,0(3)	76,2(4)
$\beta$	-	-120,2(5)	170,1(2)	-	133,7(3)	-130,5(5)	-169,5(3)	-171,4(3)	-177,4(2)	-173,3(2)	-179,8(3)	-177,9(3)
$\gamma$	53,8(5)	55,1(7)	43,8(4)	53,5(5)	56,8(4)	50,5(6)	177,0(4)	178,7(4)	-177,4(3)	177,5(3)	178,8(3)	-176,8(4)
$\delta$	146,1(3)	145,7(5)	142,5(3)	148,4(4)	146,1(3)	142,2(4)	88,3(5)	90,4(4)	145,1(3)	93,1(4)	99,7(4)	153,4(4)
$\varepsilon$	-91,1(4)	-97,6(5)	-94,4(3)	-88,0(4)	-92,2(3)	-95,8(4)	-114,1(5)	-179,8(3)	-	-109,2(3)	-112,1(4)	-
$\zeta$	76,0(4)	73,2(4)	72,2(3)	73,2(3)	75,0(3)	70,8(4)	-73,0(5)	62,6(6)	-	-79,0(3)	-68,2(4)	-
$\chi$	-149,0(3)	-154,5(4)	-145,3(3)	-	-158,9(3)	-156,0(3)	59,3(6)	56,2(5)	79,5(5)	65,4(5)	63,7(5)	78,5(5)
$v_0$	-21,3(5)	-24,0(6)	-23,5(3)	-19,4(4)	-22,2(4)	-22,1(5)	-7,2(5)	-5,8(4)	-21,2(4)	-7,4(4)	2,3(5)	-18,9(4)
$v_1$	34,3(5)	36,1(6)	33,0(3)	33,6(4)	34,8(4)	32,5(6)	-12,8(5)	-12,1(4)	34,0(4)	-11,2(4)	-17,0(4)	35,0(4)
$v_2$	-33,6(4)	-33,8(6)	-29,8(3)	-34,6(4)	-33,5(4)	-30,5(6)	26,2(5)	24,1(4)	-33,3(4)	24,2(4)	24,2(4)	-36,8(4)
$v_3$	22,2(4)	21,0(6)	16,9(4)	24,3(4)	21,4(4)	18,2(5)	-30,7(5)	-28,2(4)	21,8(4)	-29,2(4)	-23,3(4)	26,5(4)
$v_4$	-0,7(5)	1,9(6)	4,0(4)	-3,1(4)	0,3(4)	2,3(5)	24,0(5)	21,6(4)	-0,5(4)	23,2(4)	13,6(4)	-4,8(4)
Parametry pseudorotacji												
$P$	162,8(7)	158,9(8)	155,0(7)	166,7(6)	161,2(6)	157,9(6)	31,1(7)	30,0(7)	162,5(6)	32,7(6)	13,2(7)	168,9(5)
$\tau_m$	36,1(4)	37,2(5)	33,6(4)	36,3(4)	36,2(4)	33,5(3)	31,1(4)	28,4(3)	35,7(4)	29,4(3)	25,4(3)	38,3(4)
	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C2'-endo

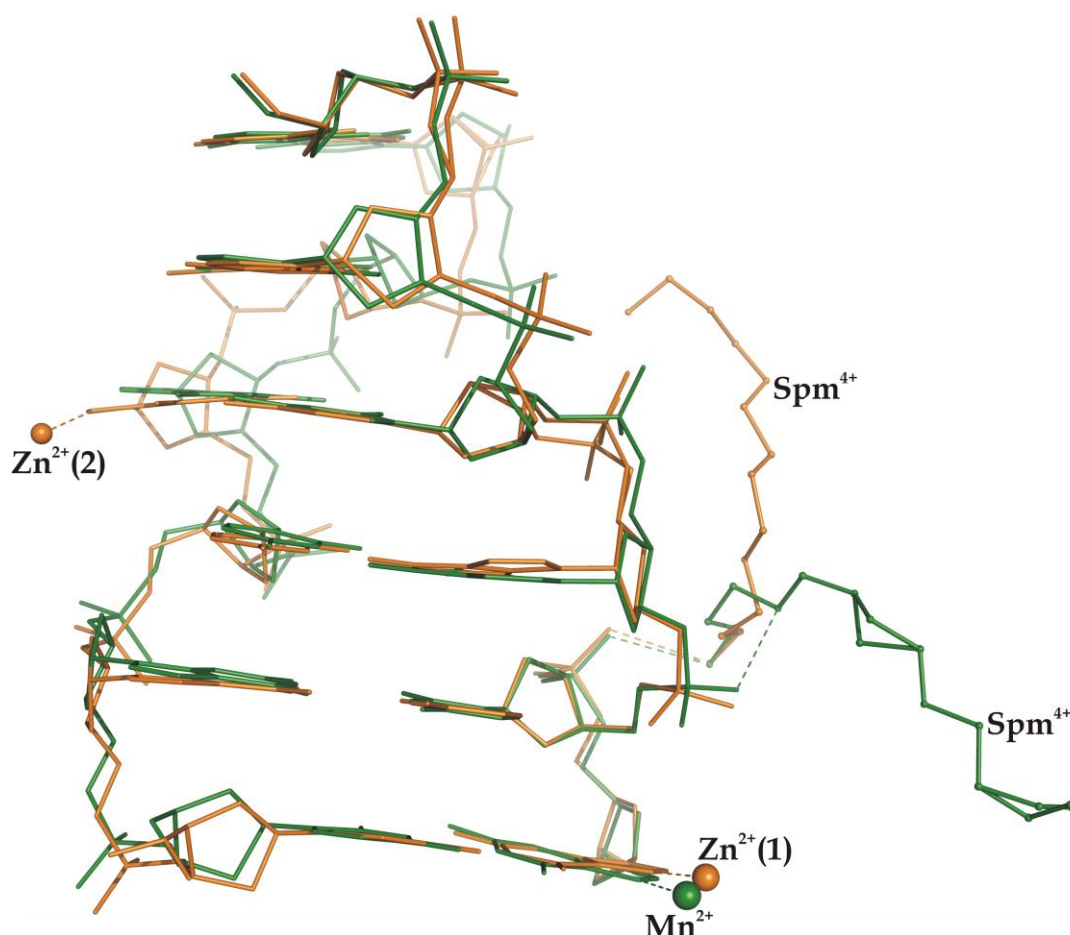
**Tabela 23.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo-fosforanowego dla struktury  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Wszystkie wartości numeryczne w tabeli podano w stopniach. Amplitudy pośladowania pierścienia furanozy ( $\tau_m$ ), kąty fazowe pseudorotacji ( $P$ ) jak ich odchylenia (wartości w nawiasach) od idealnego modelu (cyclopentanu) zostały obliczone za pomocą metody Jaskólskiego (1984). Definicje kątów torsyjnych jak w Tabeli 22.

$d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$												
Kąt	C1(I)	C3(I)	C5	C7(I)	C9	C11	G2(I)	G4(I)	G6	G8	G10	G12(I)
	C1(II)	C3(II)		C7(II)			G2(II)	G4(II)				G12(II)
$\alpha$	-	-138(1)	173,3(5)	-	-125,5(7)	168,7(6)	70(2) 52(3)	74(2) 67(2)	70,1(6)	60,6(6)	68,9(6)	69,9(8)
$\beta$	-	-132(1)	-146,1(5)	-	-144,0(6)	149,9(6)	-173(1) -174(2)	-175(2) -168(1)	-177,9(5)	-172,4(5)	-172,0(5)	178,8(6)
$\gamma$	56,3(6)	49(2) 54(2)	39,7(8)	51(2) -73(1)	48,3(9)	47,0(9)	-179(1) 172(2)	174(1) -168(1)	-177,1(7)	178,5(6)	-178,6(6)	-163,4 172,6(9)
$\delta$	140(1) 129(2)	143(2) 143(2)	136,4(6)	148,1(8)	148,2(7)	140,4(7)	92,1(9)	93,6(7)	141,7(7)	90,7(7)	98,1(7)	152(2) 96(2)
$\varepsilon$	-89(2) -96(2)	-100(2) -90(3)	-91,6(7)	-90,9(7)	-93,8(8)	-97,6(9)	-120,3(9)	-167,7(5)	-	-111,5(6)	-167,9(5)	-
$\zeta$	59(2) 98(2)	80(3) 52(3)	74,9(6)	78,6(6)	72,7(7)	81,0(8)	-67,9(9)	77,4(6)	-	-71,4(7)	69,8(6)	-
$\chi$	-156,4(6)	-159,1(7)	-147,2(6)	-154,3(6)	-158,7(6)	-150,7(6)	61(1)	53(1)	77,5(9)	59,3(9)	57,6(9)	72(1)
$\nu_0$	-25,4(8)	-25(1)	-27,2(7)	-25,2(9)	-19,7(8)	-27,2(7)	-10,5(9)	-3,4(8)	-23,5(7)	-7,3(7)	-1,9(7)	-3,6(9)
$\nu_1$	36,2(9)	25(2) 47(2)	33,9(7)	37,9(9)	32,4(8)	35,7(7)	-9,7(9)	-14,8(8)	33,6(7)	-13,4(7)	-11,7(7)	27(1) -11(1)
$\nu_2$	-32,2(9)	-15(2) -50(2)	-27,8(7)	-35,6(9)	-33,1(8)	-30,3(8)	24,6(9)	25,4(8)	-30,1(7)	27,0(7)	20,1(7)	-39(1) 19(1)
$\nu_3$	18,6(9)	1(2) 38(2)	12,4(7)	22,0(9)	22,7(8)	14,5(8)	-32,3(9)	-27,6(7)	16,9(7)	-31,6(6)	-21,8(7)	38(2) -22(1)
$\nu_4$	3,8(9)	15(2) -8,4(2)	9,2(7)	1,6(9)	-1,9(8)	8,3(8)	27,3(9)	19,7(8)	3,9(7)	25,1(7)	15,1(7)	-22(1) 15(1)

**Tabela 23. cd.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo-fosforanowego dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ .

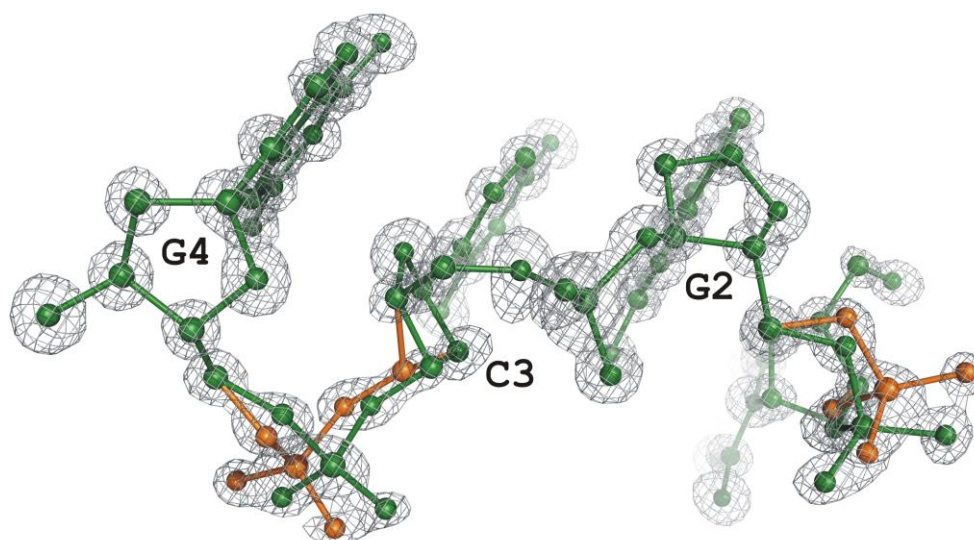
Parametry pseudorotacji												
$P$	155,4(9)	127,5(6)	146,3(6)	159,1(7)	165,0(7)	148,9(4)	37,7(9)	24,5(8)	155,0(6)	31,1(9)	23,3(6)	193,9(8)
		171,5(1)										26,3(7)
$\tau_m$	36,6(5)	26,8(3)	34,1(3)	39,1(5)	34,9(4)	35,8(3)	32,2(5)	28,5(4)	34,0(3)	32,2(5)	22,3(2)	41,1(6)
		53(1)										22,6(3)
$C2'-endo$	$C1'-exo$	$C2'-endo$	$C2'-endo$	$C2'-endo$	$C2'-endo$	$C4'-exo$	$C3'-endo$	$C2'-endo$	$C3'-endo$	$C3'-endo$	$C3'-endo$	$C1'-exo$
												$C3'-endo$

W przeciwieństwie do wyników dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ , dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  stwierdzono podwójne konformacje szkieletu cukrowo-fosforanowego i dodatkowy fragment łańcucha mający konformację  $Z_{II}$  (nukleotydy G10–C11). Ponadto różnice między kompleksami obu kationów metali widoczne są w upakowaniu i związane z odmienną pozycją polikationu sperminy<sup>4+</sup> w stosunku do helisy Z-DNA (Rys. 29). Wszystkie te aspekty są dyskutowane w szczegółach w następnych rozdziałach pracy. Najwyraźniejsze różnice pomiędzy cząsteczkami DNA w kompleksach  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  widoczne są w parametrach  $x$ - i  $y$ -displacement, tip i inclination (Lu & Olson, 2003). Wartości te różnią się dla kolejnych par nukleotydów i przejawiają się szczególnie dla pierwszej, środkowej i ostatniej pary w obu kompleksach. Dla pary 3 (środkowej; C3G4–C9G10), wartości parametru inclination ( $\eta$ ) wynoszą 29,64° dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i 63,77° dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Szerokość małej bruzdy (obliczona wg Stofer & Lavery, 1994 i El Hassan & Calladine, 1998; tj. po odjęciu 5,8 Å od promienia dwóch grup fosforanowych) dla pary 3 w strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  jest o 1,2 Å węższa w porównaniu z tą samą parą w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  (8,5 Å). Ponadto w odniesieniu do środkowej pary, obserwowane są odmienne wartości parametru  $x$ -displacement pomiędzy kompleksami z  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Wartości te wynoszą –26,29 Å (struktura z  $\text{Mn}^{2+}$ ) i 11,88 Å (struktura z  $\text{Zn}^{2+}$ ).



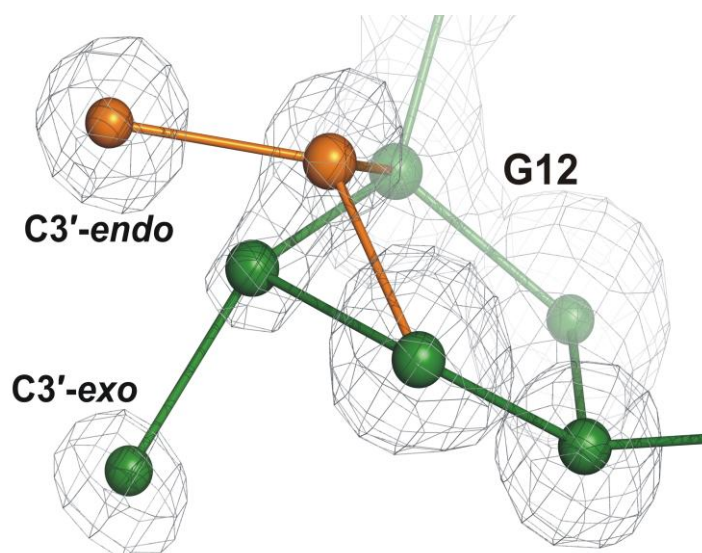
**Rys. 29.** Kompleksy  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  (zielony) i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  (pomarańczowy) przedstawione w ich wspólnym układzie współrzędnych. Wyraźnie widoczne jest odmienne położenie sperminy<sup>4+</sup>.

Pary zasad C3·G10 i G4·C9 są znacząco wygięte (ang. *buckled*), jak wskazują na to relatywnie duże wartości kąta  $\kappa$  (*buckle*) pomiędzy zasadami cytozyną i guaniną. Dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  para zasad C3·G10 ma  $\kappa = 10,88^\circ$ , a para G4·C9 ma  $\kappa = -9,98^\circ$ . Dla tych samych par zasad w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  wartości  $\kappa$  są mniejsze i wynoszą odpowiednio  $5,26^\circ$  i  $-8,23^\circ$ . Parametr ZpH (opisujący przesunięcia atomów fosforu sąsiednich par zasad od płaszczyzny  $xy$  układu odniesienia wyznaczonego dla tych par) dla pary 3 struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  wynosi  $3,91 \text{ \AA}$  dla [C3(I)G4(I)–C9G10] i  $3,77 \text{ \AA}$  dla [C3(II)G4(II)–C9G10] (Lu & Olson, 2003). Wartości te dla pary 3 w konformacji I i II kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  są znacząco różne od wartości ZpH dla tej samej pary 3 w strukturze z kationem  $\text{Mn}^{2+}$  wynoszącej  $0,50 \text{ \AA}$ . Łańcuch DNA kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  wykazuje podwójne konformacje dla nukleotydów C1–G2, C3–G4, C7 i G12, które są wyraźnie widoczne na mapie gęstości elektronowej (Rys. 30-32).

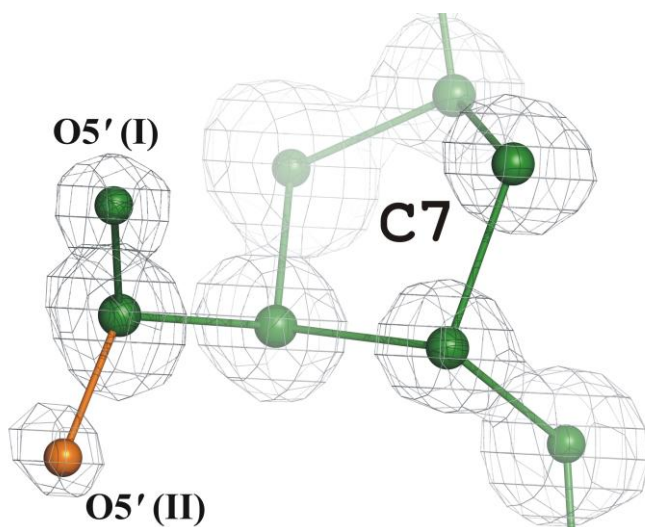


**Rys. 30.** Fragment duplexu Z-DNA w kompleksie  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  pomiędzy nukleotydami G2–G4 mający podwójną konformację szkieletu cukro–fosforanowego (I – zielony, II – pomarańczowy). Mapa gęstości elektronowej  $2Fo\text{-}Fc$ , kontur  $2,0\sigma$ .

Konformacje I i II nukleotydu C3 mają odpowiednio wartości kąta pseudorotacji ( $P$ )  $127,49^\circ$  ( $C1'\text{-exo}$ ) i  $170,52^\circ$  ( $C2'\text{-endo}$ ). Różnice w połałdowaniu pierścienia cukru obserwowane są również dla G12, gdzie konformacja I ma wartość  $P = 193,85^\circ$  ( $C3'\text{-exo}$ ), a konformacja II ma wartość  $P = 26,34^\circ$  ( $C3'\text{-endo}$ ) (Rys. 31).



**Rys. 31.** Podwójna konformacja pierścienia deoksyrybozy nukleotydu G12 (I – zielony, II – pomarańczowy). Mapa gęstości elektronowej  $2Fo\text{-}Fc$ , kontur  $1,5\sigma$ .



**Rys. 32.** Podwójna konformacja grupy 5'-OH nukleotydu C7 (I – zielony, II – pomarańczowy). Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Grupa hydroksylowa na końcu 5' nukleotydu C7 została także wymodelowana w dwóch pozycjach [ $\gamma(I) = 51,0^\circ$ ,  $\gamma(II) = -73,2^\circ$ ] (Rys. 32). Co ciekawe, żadne podwójne konformacje DNA nie pojawiają się na mapie gęstości elektronowej w strukturze  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ . Formalnie konformacja cukru nukleotydu G2 w obu strukturach jest inna: C3'-*endo* [kompleks  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ] i C4'-*exo* [kompleks  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ ], to jednak kąty pseudorotacji są podobne i wynoszą odpowiednio  $31,12^\circ$  oraz  $37,67^\circ$ . W przypadku obu kompleksów deoksyryboza na końcu 3' przyjmuje konformację C3'-*endo*, nie zachowując naprzemienności C2'-*endo*/C3'-*endo* dla nukleotydów pirymidyna/puryna typowej dla struktur Z-DNA. Zjawisko to zostało uprzednio opisane i wytłumaczone w literaturze jako efekt 3'-terminalnego nukleotydu guanozyny (Gessner *i in.*, 1989; Harper *i in.*, 1998). Obecność nietypowych konformacji cukru (takich jak C1'-*exo*, C3'-*exo*, C4'-*exo*) demonstruje plastyczność szkieletu cukrowo-fosforanowego Z-DNA w prezentowanej w tej pracy strukturze  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Takie konformacje znajdowane są w kompleksach B/Z-DNA-białko i Z/Z-DNA-białko w kluczowych miejscach interakcji DNA-białko (Ha *i in.*, 2003; de Rosa *i in.*, 2010). Ponadto tego typu konformacje cukru są często skorelowane z wysoką wartością parametru *buckle* (Eichman *i in.*, 1999), co również zostało zademonstrowane na przykładzie kompleksu  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ .

Grupy fosforanowe w dupleksach Z-DNA mogą przybierać jedną z dwóch konformacji  $Z_I$  i  $Z_{II}$  (Rys. 19 i 20, Tabela 6), które są niezależne od sekwencji (Harper *i in.*, 1998, Thiagarajan *i in.*, 2005). Zasugerowano, że konformacja  $Z_{II}$  jest głównie związana z oddziaływaniami grup fosforanowych z akwakompleksami  $Mg^{2+}$  (Gessner *i in.*, 1989).

Występowanie konformacji  $Z_{II}$  zostało także opisane dla kompleksu Z-DNA–spermina<sup>4+</sup> (Egli *i in.*, 1991; Bancroft *i in.*, 1994). W przedstawianych w tej pracy strukturach, konformację  $Z_{II}$  można przypisać grupie fosforanowej między nukleotydami G4–C5 w obu kompleksach;  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  ( $\zeta = 62,6^\circ$ ) i  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  ( $\zeta = 77,4^\circ$ ). Podobnie do innych struktur Z-DNA, w których akwakompleks metalu koordynuje do N7\_G6, jedna z cząsteczek wody ze sfery koordynacyjnej tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu z grupy fosforanowej między nukleotydami G4–C5, stabilizując tym samym konformację  $Z_{II}$ . Obecność konformacji  $Z_{II}$  można stwierdzić także dla grupy fosforanowej między nukleotydami G10–C11 ( $\zeta = 69,8^\circ$ ) z  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  i może być ona wiązana z oddziaływaniem cząsteczki wody o numerze 233 (Woda233) ze sfery koordynacyjnej kationu  $Zn^{2+}(2)$ . Kąty torsyjne szkieletu cukrowo–fosforanowego mającego dwie konformacje dla grup fosforanowych nukleotydów G2 i G4 są typowe dla sekwencji pirymidyna/puryna dla formy Z-DNA (Svozil *i in.*, 2008; Rys. 30). Z drugiej strony widoczne są różnice w wartościach kątów  $\alpha$  i  $\gamma$  dla konformacji G2(I) oraz G2(II) w kompleksie  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Kąty te wynoszą odpowiednio  $\alpha = 70,3^\circ$  i  $52,6^\circ$  oraz  $\gamma = -179,7^\circ$  i  $172,3^\circ$ . Kąty  $\alpha$  i  $\beta$  nukleotydu C5 w kompleksach z  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  zawarte są w przedziale przypisanym konformacji  $Z_{II}$  i wynoszą odpowiednio  $\alpha = 168,0^\circ$  i  $173,3^\circ$  oraz  $\beta = 170,1^\circ$  i  $146,1^\circ$ . Przedstawione tu wyniki dla kompleksów  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  potwierdzają wcześniejsze wnioski, że akwakompleksy metali wpływają na możliwość występowania form  $Z_I/Z_{II}$  oraz na ich lokalizację w strukturach Z-DNA (Schneider *i in.*, 1992).

### V.1.3 Koordynacja kationów metali

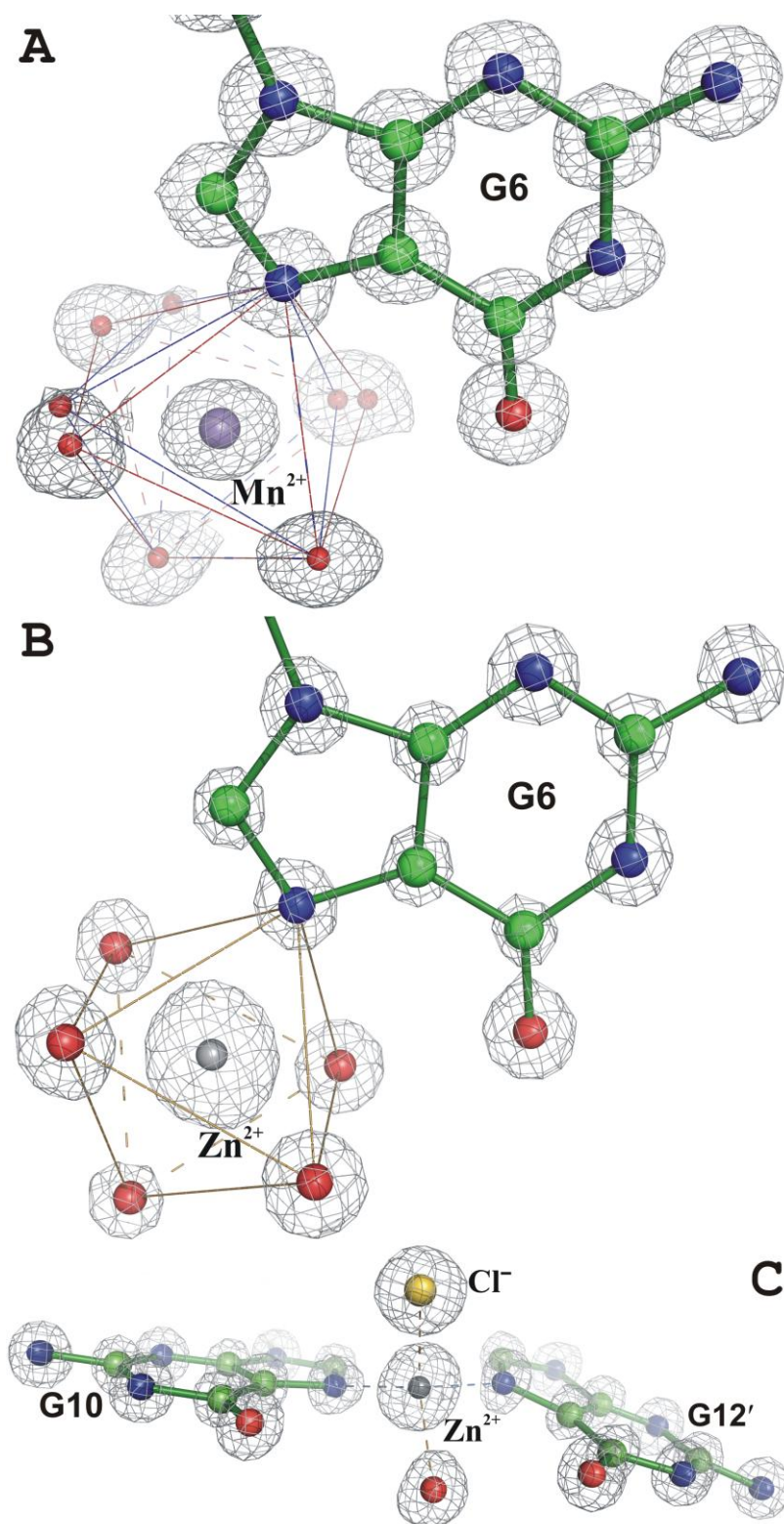
Kryształy  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$  zostały z powodzeniem nasączone kationami  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  (Rys. 28 i 33). Jony te koordynują preferencyjnie do atomów N7 guaniny, jak to wcześniej zademonstrowano dla struktur Z-DNA z kationami metali przejściowych ( $Cu^{2+}$  i  $Co^{2+}$ ; Kagawa *i in.*, 1991; Gao *i in.*, 1993).  $Mn^{2+}$  oddziałuje z G6 poprzez bezpośrednią koordynację do atomu N7 w odległości 2,257(3) Å (Tabela 24). Jon  $Mn^{2+}$  ma oktaedryczną sferę koordynacyjną, w której pozostałe miejsca ligandów są zajęte przez cząsteczki wody (Rys. 33A). Jednakże trzy z pięciu cząsteczek wody koordynowanych przez  $Mn^{2+}$  wykazują nieuporządkowanie i zostały wymodelowane w dwóch alternatywnych pozycjach. W tym kontekście, sfera koordynacyjna wokół jonu  $Mn^{2+}$  rozpatrywana była jako składająca się z dwóch częściowo obsadzonych oktaedrów (Tabela 24).

**Tabela 24.** Geometria sfer koordynacyjnych ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ ) kationów metali w strukturach  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  oraz  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Odchylenia standardowe podane są w nawiasach.

	Odległość			Kąty					
Woda250b	1,946(34)								
Woda203a	2,075(12)	148(1)							
Woda252	2,138(3)	119(1)	92,2(3)						
Woda251	2,158(4)	85(1)	92,4(4)	85,0(2)					
Woda216a	2,186(4)	52(1)	96,9(3)	169,0(2)	88,4(2)				
Woda250a	2,207(4)	28(1)	174,3(3)	92,3(2)	91,5(2)	79,1(2)			
Woda216b	2,255(27)	79(1)	69,7(7)	161,9(6)	95,4(7)	27,9(6)	105,8(6)		
N7_G6	2,257(3)	93(1)	91,6(4)	93,8(2)	175,9(2)	92,2(2)	84,6(1)	87,0(7)	
Woda203b	2,310(20)	155(1)	8,4(8)	85,7(6)	97,0(6)	103,9(6)	171,0(6)	76,3(9)	87,0(6)
<b>Mn<sup>2+</sup></b>		Woda250b	Woda203a	Woda252	Woda251	Woda216a	Woda250a	Woda216b	N7(G6)
	Odległość			Kąty					
Woda205	2,097(6)								
Woda234	2,110(6)	178,1(3)							
N7_G6	2,112(6)	92,9(2)	86,2(2)						
Woda235	2,113(9)	90,4(4)	90,5(4)	176,3(4)					
Woda201	2,116(6)	87,1(3)	91,3(3)	90,2(2)	88,2(4)				
Woda210	2,140(8)	93,3(3)	88,4(3)	92,2(3)	89,3(4)	177,5(3)			
<b>Zn<sup>2+</sup>(1)</b>		Woda205	Woda234	N7(G6)	Woda235	Woda201			
	Odległość			Kąty					
Woda233	1,944(5)								
N7_G10	1,990(6)	111,0(3)							
N7_G12 <sup>ii</sup>	2,032(5)	100,7(2)	109,7(3)						
Cl <sup>-</sup>	2,209(2)	110,2(2)	112,9(2)	111,7(2)					
<b>Zn<sup>2+</sup>(2)</b>		Woda233	N7(G10)	N7(G12 <sup>ii</sup> )					

Pierwszy oktaedr (*a*) zawiera cząsteczki wody mające większe obsadzenie (0,78, 0,77 i 0,52). Wiązania koordynacyjne utworzone pomiędzy kationem  $\text{Mn}^{2+}$ , a pięcioma cząsteczkami wody w oktaedrze *a* mają długości od 2,075(12) do 2,207(4)  $\text{\AA}$ , natomiast kąty  $\text{N7-Mn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$  wartości od 84,6(1) do 93,8(2) $^\circ$ . Dla drugiego oktaedru (*b*; mniejsze obsadzenie) długość wiązań  $\text{Mn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$  mieści się w przedziale od 1,946(34) do 2,310(20)  $\text{\AA}$ , a kąty  $\text{N7-Mn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$  od 87,0(7) do 93,8(2) $^\circ$ . Kąt  $\text{N7-Mn}^{2+}\text{-Woda251}$  jest jednakowy dla obu oktaedrów i wynosi 175,9(2) $^\circ$ . W sferze hydratacyjnej kationu  $\text{Mn}^{2+}$  występują oddziaływania wodorowe z udziałem atomów OP1\_C5, O6\_G6 i O6\_G12<sup>i</sup> ( $3/2-x$ ,  $1-y$ ,  $z+1/2$ ) z cząsteczki symetrycznie równoważnej. Należy zaznaczyć, że w trakcie analizy kontaktów międzycząsteczkowych w sieci krystalicznej kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  zauważono błędy dotyczące nieprawidłowych kodów symetrii podawanych przez dwa powszechnie wykorzystywane programy do struktury wizualizacji białek i kwasów nukleinowych (*Coot* i *PyMol*). Z tych względów wygenerowane kody symetrii były weryfikowane manualnie.





**Rys. 33.** Oktaedryczne sfery koordynacyjne kompleksów (A)  $\text{Mn}^{2+}$  (fiolet) i (B)  $\text{Zn}^{2+}(1)$  (szary) przy nukleotydzie G6. Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$  ma kontur odpowiednio  $1\sigma$  i  $2.5\sigma$ . Oktaedry zaznaczone są przerywaną linią (dwa alternatywne oktaedry dla kompleksu z  $\text{Mn}^{2+}$  pokazane są jako czerwony/niebieski). (C) Tetraedryczna sfera koordynacyjna kationu  $\text{Zn}^{2+}(2)$  (szary). Mapa  $2Fo-Fc$ , kontur  $2,0\sigma$ .

Atom N7\_G6 jest także preferowanym miejscem koordynacji dla kationu  $\text{Zn}^{2+}(1)$  (Rys. 33B). Długości wiązań między  $\text{Zn}^{2+}(1)$ , a jego sześcioma ligandami (oktaedr; N7 i pięć cząsteczek wody) są podobne i mieszczą się w wąskim przedziale od 2,110(6) do 2,140(8) Å (Tabela 24). Wiązanie  $\text{Zn}^{2+}(1)$ –N7 jest krótsze [2,112(6) Å] niż odpowiadające mu wiązanie dla  $\text{Mn}^{2+}$ . Kąty dla oktaedru  $\text{Zn}^{2+}(1)$  zawierają się w przedziałach 86,2(3) – 93,3(9)° i 176,9(7) – 178,1(7)°. Sfera koordynacyjna kationu  $\text{Zn}^{2+}(1)$ , bez cząsteczek wody w alternatywnych pozycjach, jest w pełni uporządkowana i w porównaniu z  $\text{Mn}^{2+}$  bardziej przypomina regularny oktaedr. Poza wiązaniami wodorowymi z atomami OP1\_C5, O6\_G6 i O6\_G12<sup>i</sup>, w sferze hydratacyjnej  $\text{Zn}^{2+}(1)$  zaobserwowano także oddziaływania cząsteczek wody z atomami OP2\_C5 i N4\_C1<sup>i</sup>. Oddziaływań takich nie stwierdzono w sferze koordynacyjnej  $\text{Mn}^{2+}$ , co może wyjaśniać jej bardziej nieuporządkowany charakter.

Drugi kation cynku,  $\text{Zn}^{2+}(2)$ , jest koordynowany jednocześnie przez atomy N7\_G10 i N7\_G12<sup>ii</sup> ( $x+1/2$ ,  $3/2-y$ ,  $1-z$ ) z symetrycznie równoważnej cząsteczki, a długości wiązań  $\text{Zn}^{2+}(2)$ –N7 wynoszą odpowiednio 1,990(6) i 2,032(5) Å (Tabela 24, Rys. 33C). Woda233 i jon  $\text{Cl}^-$  uzupełniają tetraedryczną sferę koordynacyjną  $\text{Zn}^{2+}(2)$ . Długość wiązania  $\text{Zn}^{2+}(2)$ – $\text{Cl}^-$  [2,209(2) Å] jest tylko nieznacznie krótsza od długości  $\text{Zn}^{2+}$ – $\text{Cl}^-$  (2,27 Å) dla kryształu  $\gamma$ - $\text{ZnCl}_2$  (Brehler, 1961). Woda233 tworzy także wiązania wodorowe z atomami O6\_G10 i O6\_G12<sup>ii</sup>, a odległości  $\text{O}\cdots\text{O}$  wynoszą odpowiednio 3,322(7) i 2,656(6) Å. Woda233 mostkuje donorowe atomy O6 w kompleksie G10– $\text{Zn}^{2+}(2)$ –G12<sup>ii</sup>. Kąty w sferze koordynacyjnej  $\text{Zn}^{2+}(2)$  zawarte są w przedziale od 100,7(2) do 112,9(9)°. Odległość pomiędzy dwoma atomami N7 w tej sferze koordynacyjnej wynosi 3,289(6) Å.

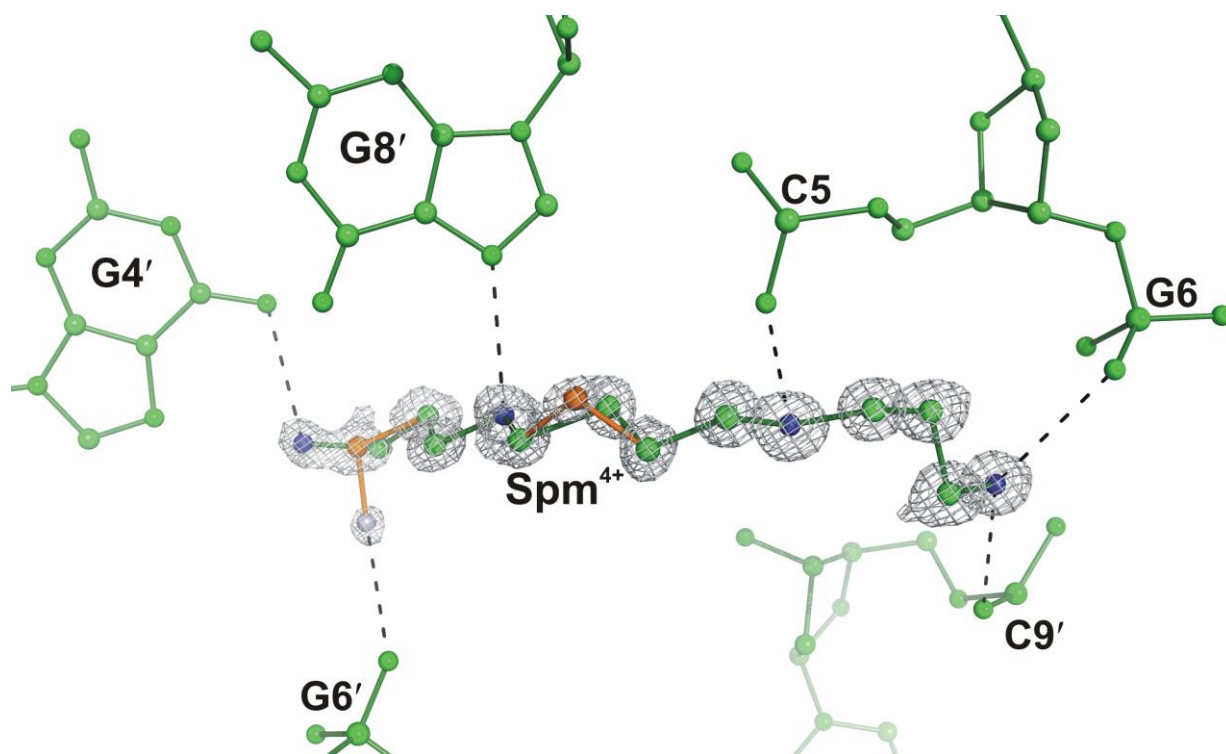
Bliskie odległości pomiędzy kationami metali są stosunkowo częste w strukturach Z-DNA (Harper *i in.*, 1998). Dwa jony  $\text{Zn}^{2+}$  w kompleksie  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  są odległe od siebie o 6,307(7) Å. Takie rozmieszczenie kationów  $\text{Zn}^{2+}$  umożliwia atomowi O6\_G12<sup>ii</sup> przyjęcie roli zwornika dla utworzenia mostka wodorowego pomiędzy cząsteczkami wody 201 i 233, należącymi do sfer hydratacyjnych kationów  $\text{Zn}^{2+}(1)$  i  $\text{Zn}^{2+}(2)$ .

#### V.1.4 Oddziaływania kationu sperminy<sup>4+</sup> z dupleksem $\text{d}(\text{CGCGCG})_2$

Cząsteczka sperminy (Spm) istnieje w całkowicie sprotonowanej formie ( $\text{Spm}^{4+}$ ) w szerokim zakresie wartości pH i w takiej formie powinna być rozpatrywana jako obiekt oddziaływań z innymi biocząsteczkami. Pomimo to, kation sperminy<sup>4+</sup> został wymieniony tylko w czterech strukturach zdeponowanych w bazie PDB (1se6, 1y0q, 1mg9 i 1kgk), w przeciwieństwie do 101 struktur, w których jako ligand została zdeponowana nierealistyczna

niesprotonowana forma ligandu Spm. Długość wiązań i wartości kątów walencyjnych dla Spm i  $\text{Spm}^{4+}$  różnią się dość istotnie, a różnica ta jest szczególnie ważna w przypadku wysokiej rozdzielczości.

Chociaż sposób upakowania cząsteczek Z-DNA w obu kompleksach  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  jest typu A, to w każdym z tych kompleksów pojedyncza cząsteczka sperminy<sup>4+</sup> przybiera różną pozycję w stosunku do kwasu nukleinowego. Schemat oddziaływań sperminy<sup>4+</sup> z dupleksami Z-DNA w kompleksie z  $\text{Mn}^{2+}$  jest podobny do opisanego dla struktur Z-DNA mających typ upakowania A. Cała cząsteczka sperminy<sup>4+</sup> w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  jest wyraźnie widoczna na mapie gęstości elektronowej, co jest rzadko spotykane nawet w przypadku wysokorozdzielczych struktur Z-DNA (Rys. 34).



**Rys. 34.** Kation sperminy<sup>4+</sup> w strukturze kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ . Konformer  $\text{Spm}^{4+}$  o mniejszym obsadzeniu oznaczony jest na pomarańczowo. Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Atom C8 kationu  $\text{Spm}^{4+}$  został wymodelowany w dwóch pozycjach mających obsadzenia 0,52 i 0,48. Terminalne atomy C13 i N14 występują w podwójnej konformacji z obsadzeniem 0,78 i 0,22. Sposób oddziaływań cząsteczki  $\text{Spm}^{4+}$  z DNA w kompleksie z  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ , a także jej kąty torsyjne, zostały przedstawione w Tabeli 25.

Kwestia konformacji tetrakationu sperminy wymaga specjalnej uwagi. W kompleksie z  $\text{Mn}^{2+}$ , główny konformer (I) ma generalnie większość kątów torsyjnych bliskich  $180^\circ$  (*trans*).

Orientację *gauche* mają wiązania C6–C7 ( $-67,76^\circ$ ) i C12–C13 ( $62,18^\circ$ ). Dla konformacji II wiązanie C13–N14 ma orientację *gauche* ( $-76,30^\circ$ ), podczas gdy fragment N5–C6–C7–C8(II)–C9–N10 został wymodelowany z dwoma zaskakującymi wartościami kątów torsyjnych:  $-107,55^\circ$  (C6–C7) i  $-120,77^\circ$  [C8(II)–C9]. Liczne próby sprowadzenia tych kątów torsyjnych do standardowych zakresów naprzeciwległych zakończyły się niepowodzeniem, a najlepszym odzwierciedleniem mapy gęstości elektronowej był model przedstawiony na Rys. 34 i w Tabeli 25. Można, zatem przypuszczać, że pewna frakcja cząsteczek  $\text{Spm}^{4+}$  w kryształach przybrała niekorzystną konformację, prowadzącą w konsekwencji do nieuporządkowania.

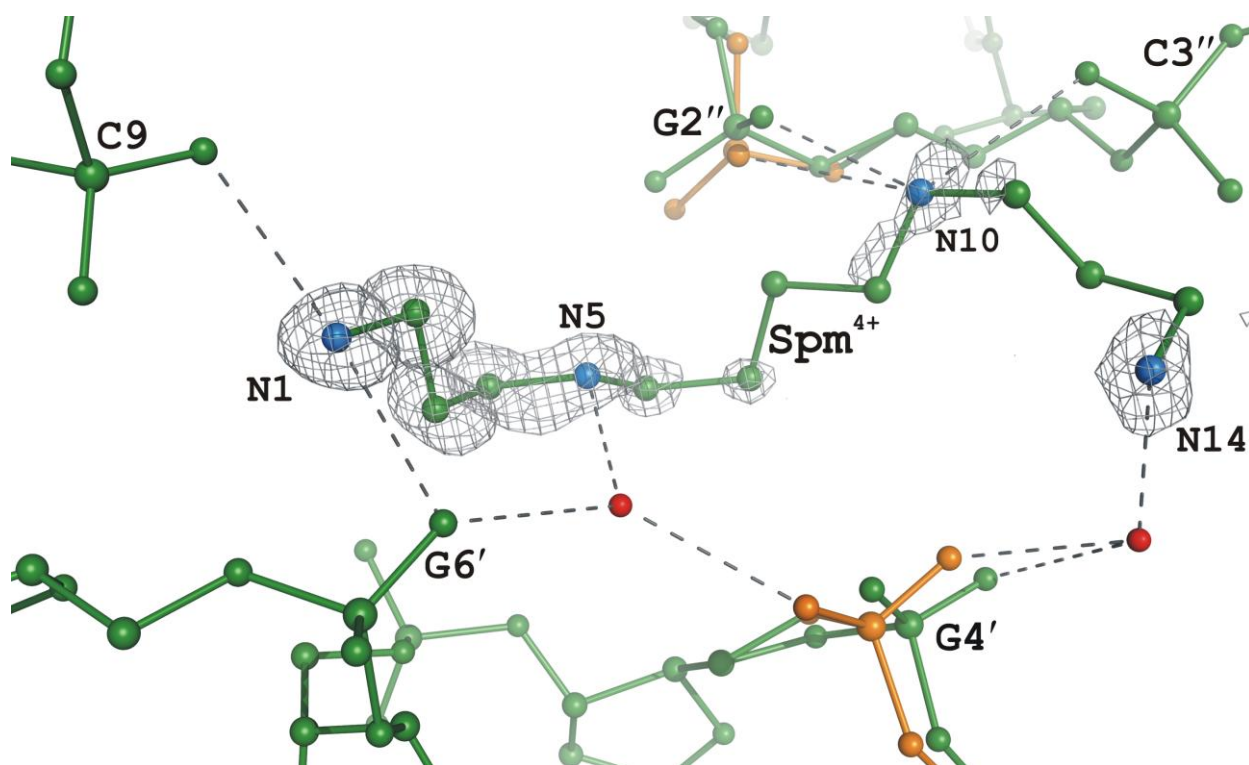
**Tabela 25.** Oddziaływania i kąty torsyjne ( $^\circ$ ) kationu sperminy $^{4+}$  w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{--Spm}^{4+}\text{--Mn}^{2+}$ . Odchylenia standardowe podane są w nawiasach. Odległości podano w Å.

Atom sperminy $^{4+}$									
N1		N5		N10		N14(I)		N14(II)	
Wiązanie wodorowe	Odległość	Wiązanie wodorowe	Odległość	Wiązanie wodorowe	Odległość	Wiązanie wodorowe	Odległość	Wiązanie wodorowe	Odległość
OP1_G6	2,926(5)	OP2_C5	2,729(5)	N7_G8 <sup>iv</sup>	2,821(7)	N7_G4 <sup>iv</sup>	3,077(6)	OP2_G6 <sup>iii</sup>	3,022(20)
OP2_C9 <sup>iii</sup>	2,854(5)	Woda111	2,825(6)	Woda112(I)	3,166(7)	O6_G4 <sup>iv</sup>	2,825(5)	Woda126	2,843(8)
Woda207	2,741(5)	Woda214	3,061(7)	Woda123	2,779(7)	Woda113	2,863(5)	Woda246	3,207(8)
						Woda233	2,867(5)		
Kąty torsyjne									
N1 - C2 - C3 - C4						175,8(5)			
C2 - C3 - C4 - N5						-75,2(6)			
C3 - C4 - N5 - C6						-175,0(5)			
C4 - N5 - C6 - C7						-167,7(6)			
N5 - C6 - C7 - C8(I)/N5 - C6 - C7 - C8(II)						-67(1)/-107(2)			
C6 - C7 - C8(I) - C9/C6 - C7 - C8(II) - C9						-167(1)/161(2)			
C7 - C8(I) - C9 - N10/C7 - C8(II) - C9 - N10						-162(1)/-120(3)			
C8(I) - C9 - N10 - C11/C8(II) - C9 - N10 - C11						171(1)/-161(2)			
C9 - N10 - C11 - C12						-179,0(10)			
N10 - C11 - C12 - C13(I)/N10 - C11 - C12 - C13(II)						166(3)/-178(2)			
C11 - C12 - C13(I) - N14(I)/C11 - C12 - C13(II) - N14(II)						62(4)/-76(2)			

<sup>iii</sup> ( $-x, y-1/2, 1/2-z$ )

<sup>iv</sup> ( $1-x, y-1/2, 1/2-z$ )

Ogólna jakość mapy gęstości elektronowej dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{--Spm}^{4+}\text{--Zn}^{2+}$  pozwoliła na wymodelowanie kationu  $\text{Spm}^{4+}$  w otoczeniu dupleksów Z-DNA (Rys. 35). Jednakże dla fragmentu C8–C13 kationu sperminy $^{4+}$ , jakość mapy gęstości elektronowej jest gorsza niż dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{--Spm}^{4+}\text{--Mn}^{2+}$ , szczególnie w obszarze atomów C8 i C12–C13.



**Rys. 35.** Kation sperminy<sup>4+</sup> w strukturze kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup>. Mapa gęstości elektronowej 2*Fo*-*Fc*, kontur 1σ.

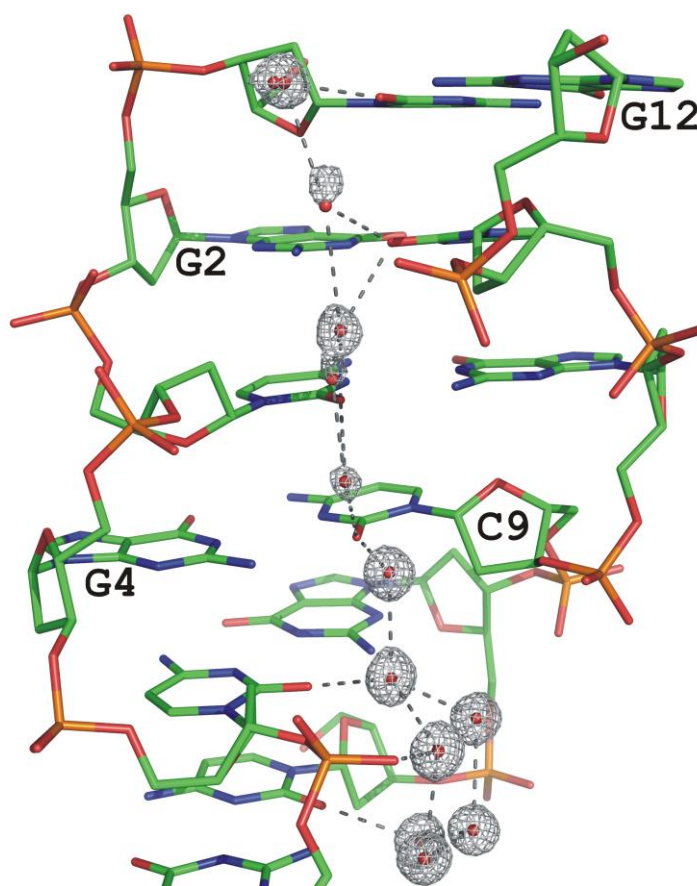
Interesującym faktem zaobserwowanym dla kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup> jest to, że spermina<sup>4+</sup> zaangażowana jest w wiązania wodorowe tylko z grupami fosforanowymi trzech dupleksów Z-DNA (Rys. 35). Dwie grupy fosforanowe dwóch sąsiadujących ze sobą dupleksów OP2\_C9 [2,801(10) Å] i OP1\_G6<sup>v</sup> (1-*x*, *y*+1/2, 3/2-*z*) [2,971(11) Å] są stabilizowane wiązaniami wodorowymi z atomem N1\_Spm<sup>4+</sup>. Dwa dodatkowe wiązania wodorowe N1...O są utworzone między N1\_Spm<sup>4+</sup>, a cząsteczkami wody 214 [2,770(12) Å] i 228 [3,161(15) Å]. Z kolei atom N5\_Spm<sup>4+</sup> tworzy wiązania wodorowe z wodami 219 [2,816(10) Å], 229 [2,780(9) Å] i 231 [2,984(12) Å]. Atom N10\_Spm<sup>4+</sup> jest zaangażowany w oddziaływania z OP2(I)\_G2/OP2(II)\_G2<sup>vi</sup> (1/2-*x*, -*y*, *z*+3/2) [2,744(12)/3,268(12) Å] oraz z OP2\_C3<sup>vi</sup> [3,052(9) Å]. Długość wiązania wodorowego Woda238-N14\_Spm<sup>4+</sup> wynosi 2,29(6) Å.

### V.1.5 Hydratacja

Kompleksy Mn<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> opisywane w tej pracy wykazują podobieństwo do innych wysokorozdzielczych struktur Z-DNA pod względem architektury sfery hydratacyjnej, która zawiera rozbudowaną sieć wiązań wodorowych stabilizujących cząsteczki DNA i ich upakowanie w kryształ. Część asymetryczna komórki elementarnej zawiera 88 i 77 cząsteczek



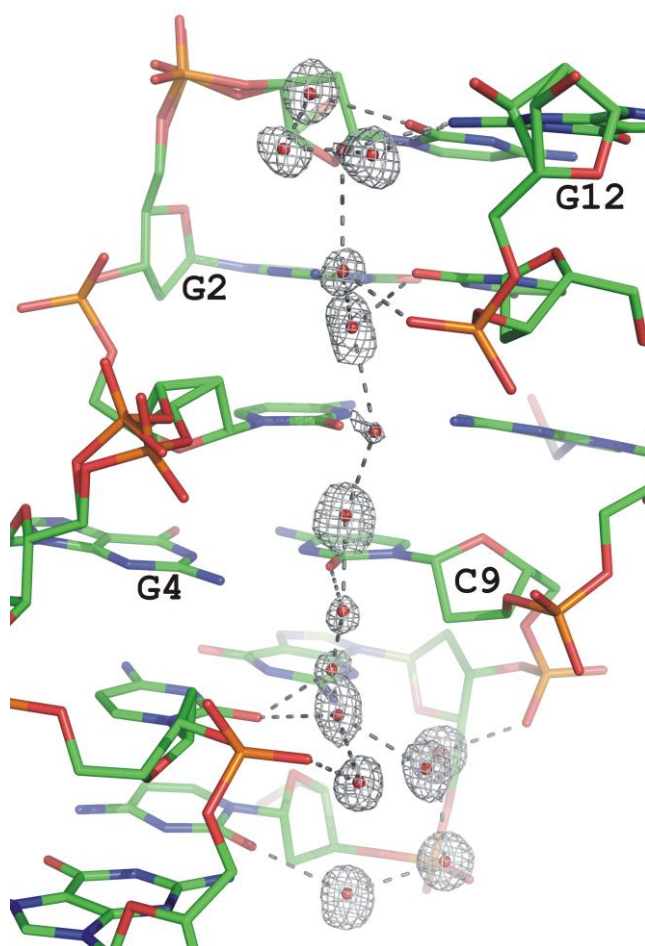
wody odpowiednio dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Całkowity współczynnik obsadzenia mają 32 cząsteczki wody w kompleksie z  $\text{Mn}^{2+}$  i 38 w kompleksie z  $\text{Zn}^{2+}$ . Duża liczba cząsteczek wody ma częściowe obsadzenie i są one często usytuowane w pobliżu nieuporządkowanych pozycji DNA (kompleks  $\text{Zn}^{2+}$ ). Liczba bliskich par cząsteczek wody (odległość  $< 2,3 \text{ \AA}$ ) wynosi 21 dla struktury z  $\text{Mn}^{2+}$  i cztery z  $\text{Zn}^{2+}$ . Suma wszystkich obsadzeń cząsteczek wody w części asymetrycznej wynosi 77,5 i 62,1 odpowiednio dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ , co może być porównane z wartością (suma obsadzeń) 78,6 cząsteczek wody w części asymetrycznej struktury 3p4j rozwiązywanej z rozdzielczością  $0,55 \text{ \AA}$ , która ma tę samą komórkę elementarną (Brzeziński *i in.*, 2011). Ten rezultat ilustruje znany fakt, że atomowa interpretacja hydratacji w kryształach biomakromolekuł poprawia się wraz z rozdzielczością.



**Rys. 36.** Hydratacja małej bruzdy DNA kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Pewne charakterystyczne cechy lokalizacji cząsteczek  $\text{H}_2\text{O}$  w kryształach Z-DNA takie jak (i) mostkowanie grupy egzoaminowej guaniny z atomami tlenu grup fosforanowych, (ii) wiązania wodorowe z grupami fosforanowymi, (iii) brak cząsteczek wody oddziałujących z

atomami N3\_G oraz (iv) dwie cząsteczki wody tworzące wiązania wodorowe z atomami O6 guanin obserwowane są w obu strukturach. Jednakże brak ciągłości w systemie wiązań wodorowych między cząsteczkami H<sub>2</sub>O, a atomami O2 cytozyny jest widoczny dla par zasad C5·G8 i C7·G6 w strukturze d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup> oraz dla C1·G12, C6·G7 i C11·G2 w d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup> (Rys. 36 i 37). Ponadto jedna cząsteczka wody w każdej strukturze jest usytuowana pomiędzy dwoma guaninami z przeciwnych łańcuchów DNA: O6\_G2···Woda210···O6\_G10 (kompleks z Mn<sup>2+</sup>) i O6\_G4···Woda233···O6\_G8 (kompleks z Zn<sup>2+</sup>). W obu strukturach znaleziono oddziaływanie wodorowe typu O4'\_G6···Woda···N1\_Spm<sup>4+</sup>.



**Rys. 37.** Hydratacja małej bruzdy DNA dla kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>-Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup>. Mapa gęstości elektronowej 2*F<sub>o</sub>*-*F<sub>c</sub>*, kontur 1σ.

Dla kompleksu z kationami Zn<sup>2+</sup>, poza dwoma dominującymi pikami dla Zn<sup>2+</sup>(1) i Zn<sup>2+</sup>(2), na różnicowej mapie anomalnej zaobserwowano także trzeci pik (~6,2σ), który pokrywał się z mapą gęstości elektronowej w pobliżu atomu N7\_G4. Jednakże, dodatkowy jon Zn<sup>2+</sup> wstawiony w tej pozycji udokładnił się z obsadzeniem poniżej 0,20. Dlatego też pik został

przypisany cząsteczce wody z obsadzeniem 1,0. Jednakże, krótka odległość Woda232...N7\_G4 [2,16(1) Å] sugeruje, że obecność cząteczki wody w tym miejscu jest wątpliwa.

#### V.1.6 Upakowanie w sieci krystalicznej

W kryształach lewoskrętnych dupleksów Z-DNA o symetrii  $P2_12_12_1$  zidentyfikowano dwa różne sposoby upakowania, oznaczone jako A i B (Brzezinski *i in.*, 2011). Występowanie danego typu upakowania nie jest w pełni skorelowane z obecnością cząsteczki sperminy<sup>4+</sup> lub jonów metalu. Różnica pomiędzy tymi dwoma nieizomorficznymi sposobami upakowania jest konsekwencją międzycząsteczkowych oddziaływań dupleksów Z-DNA usytuowanych (z różnym przesunięciem i rotacją) wzdłuż osi z. Oba prezentowane tutaj kompleksy mają typ upakowania A. Jednakże system wiązań wodorowych w układzie spermina<sup>4+</sup>/helisy Z-DNA jest w obu kompleksach zasadniczo odmienny (Rys. 29, 34 i 35).

#### V.1.7 Dyskusja wyników dla kompleksów $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup>

oraz  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup>

W niniejszej pracy zaprezentowano nowe, dotychczas nie opisane w literaturze struktury kompleksów  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup> i  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup>. Rezultaty te mają szczególne znaczenie, ponieważ tylko niewielka liczba kompleksów Z-DNA-kation metalu przejściowego została zdeponowana w PDB czy NDB. Struktury obu kompleksów mają najwyższą rozdzielczość i jakość udokładnianych parametrów spośród wszystkich tego typu układów w PDB. Zastosowanie pełnomacierzowego udokładniania metodą najmniejszych kwadratów, dostarczyło wielu precyzyjnych danych strukturalnych wraz z odchyleniami standardowymi. Dupleksy Z-DNA kompleksów  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Mn<sup>2+</sup> i  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup> mają ogólną budowę podobną do wcześniej opisywanych w literaturze helis Z-DNA (por.: Egli *i in.*, 1991; Schneider *i in.*, 1992; Ho & Mooers, 1997; Harper *i in.*, 1998; Brzeziński *i in.*, 2011). Jednakże, pomimo dowodów świadczących o wysokiej regularności i stabilności (sztywności) helis Z-DNA w układach bez kationów metali dwuwartościowych (Brzeziński *i in.*, 2011), elastyczność szkieletu cukrowo-fosforanowego obserwowana dla kompleksu  $d(CGCGCG)_2$ -Spm<sup>4+</sup>-Zn<sup>2+</sup> sugeruje, że zmiany środowiska jonowego (siły jonowej, typu kationu metalu i pH) wokół Z-DNA mają znaczący wpływ na labilność konformacyjną DNA, a także pozycję i sposób oddziaływań polikationu sperminy<sup>4+</sup> z dupleksami DNA. W kompleksie z kationami cynku łańcuch DNA jest destabilizowany do takiego stopnia, że przyjmuje w kilku fragmentach podwójne konformacje. W tym kontekście interesujące jest, że pomimo



wieloletnich badań krystalograficznych struktury dupleksów Z-DNA o sekwencji d(CGCGCG)<sub>2</sub>, wyniki kolejnych eksperymentów krystalograficznych, szczególnie wysokorozdzielczych, wciąż ujawniają nowe wcześniej nieobserwowane szczegóły budowy Z-DNA. Dla większości struktur d(CGCGCG)<sub>2</sub>, konformacja Z<sub>II</sub> jest obecna dla tej samej pozycji G4–C5 (Harper *i in.*, 1998), chociaż w kilku przypadkach była obserwowana dla pozycji 2–3, 8–9 lub 10–11. Dla omawianego kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> konformacja Z<sub>II</sub> została przypisana dla typowej pozycji G4–C5 i rzadziej spotykanej, G10–C11. Podwójne konformacje (I i II) łańcucha DNA w kompleksie z Zn<sup>2+</sup> zachowują formę Z<sub>I</sub> dla obu wariantów. Jest to odmienna sytuacja w porównaniu z innymi strukturami mającymi nieuporządkowany łańcuch DNA, gdzie stwierdzono występowanie konformacji Z<sub>I</sub> i Z<sub>II</sub> dla alternatywnych pozycji grup fosforanowych (Wang *i in.*, 1981; Harper *i in.*, 1998; Bharanidharan *i in.*, 2007).

Kationy [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup> i [Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup> w kompleksach z Z-DNA mają podobne długości wiązań metal<sup>2+</sup>–H<sub>2</sub>O i metal<sup>2+</sup>–N7\_G w swoich oktaedrycznych sferach koordynacyjnych. Długości wiązań Mn<sup>2+</sup>–H<sub>2</sub>O, wynoszące od 1,946(34) do 2,310(20) Å, zawierają się w podobnym przedziale jak w przypadku jonów [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup> (1,99–2,29 Å). Dla struktur Z-DNA z kationami [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup>, cząsteczka wody z najdłuższym wiązaniem Mg<sup>2+</sup>–H<sub>2</sub>O tworzy wiązanie wodorowe z atomem OP1\_5 (Gessner *i in.*, 1989). Dla diskutowanego tutaj kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> sytuacja jest dokładnie odwrotna. Oktaedryczne sfery koordynacyjne Mn<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>(1) różnią się między sobą z powodu alternatywnych pozycji trzech cząsteczek wody wokół jonu Mn<sup>2+</sup>. Woda210 ze sfery hydratacyjnej jonu Zn<sup>2+</sup>(1) tworzy dodatkowe wiązanie wodorowe z atomem OP2\_C5, w przeciwieństwie do sfery hydratacyjnej Mn<sup>2+</sup>, w której to atom OP2\_C5 jest zaangażowany w wiązanie wodorowe do atomu N5\_Spm<sup>4+</sup>. Ta różnica w tworzeniu wiązania wodorowego z cząsteczką H<sub>2</sub>O lub sperminą<sup>4+</sup> jest skorelowana z wartościami kątów β łańcucha DNA dla nukleotydu C5 wynoszącymi 170,1° dla kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> oraz 146,6° dla d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>.

Poza dupleksem d(CGCGCG)<sub>2</sub> badanym w tej pracy, jony Mn<sup>2+</sup> zostały także zlokalizowane w czterech strukturach 5'–d(CACGCG)·3'–d(CGCGTG) (Z-DNA) mających grupy przestrzenne C222<sub>1</sub> (jedna), P6<sub>5</sub> (jedna) i P2<sub>1</sub> (dwie). Struktury te, o kodach PDB: 4dwy, 4dy8, 3g2r i 3fq5, zostały rozwiązane odpowiednio z rozdzielczością 1,61, 1,76, 2,15 i 2,80 Å (Mandal *i in.*, 2012). W strukturach 3g2r, 3fq5 i 4dwy kation Mn<sup>2+</sup> koordynowany jest przez dwie zasady azotowe, a w 4dy8 jon Mn<sup>2+</sup> wykazuje nieuporządkowanie i został wymodelowany w dwóch pozycjach. Oktaedryczna sfera koordynacyjna może być przypisana tylko kationowi Mn<sup>2+</sup>(1) w strukturze 4dwy.

**Tabela 26.** Sfery koordynacyjne w kompleksach Z-DNA–Mn<sup>2+</sup>. Atomy pochodzące z symetrycznie równoważnych cząsteczek są oznaczone gwiazdą (\*).

Kod PDB	Rozdzielczość (Å)	R (%)	Kation	Obsadzenie	$B_{iso}$ (Å <sup>2</sup> )	Ligand	Odległość (Å)
Ta praca	0,75	7,09	Mn <sup>2+</sup>	1,00	1,89 <sup>(a)</sup>	N7_G6	2,257
						Woda203a	2,075
						Woda203b	2,310
						Woda216a	2,186
						Woda216b	2,255
						Woda250a	2,207
						Woda250b	1,946
						Woda251	2,158
						Woda252	2,138
3fq5	2,80	16,70	Mn <sup>2+</sup> (1)	1,00	22,30	N7_A2	2,47
						N7_G10	2,41
						OP1_T11*	2,30
						Woda	2,23
			Mn <sup>2+</sup> (2)	1,00	37,91	N7_G4	2,21
						N7_G6*	2,57
						O6_G6*	3,18
						Woda	2,23
3g2r	2,15	26,90	Mn <sup>2+</sup>	0,25	35,16	O6_G2	2,44
						O6_G2*	2,44
						O4_T3	3,47
						O4_T3*	3,41
						Woda	2,74
						Woda*	2,78
4dwy	1,61	20,30	Mn <sup>2+</sup> (1)	1,00	12,88	N7_A2	2,36
						N7_G4	2,28
						OP1_T11*	2,09
						Woda	2,23
						Woda	2,29
						Woda	2,30
			Mn <sup>2+</sup> (2)	0,70	20,17	N7_G4	2,45
						O6_G4	2,47
						N7_G12*	2,31
						Woda	2,12
						Woda	2,27
						Woda	2,40
4dy8	1,76	22,70	Mn <sup>2+</sup> (a)	0,65	24,81	O6_G4	2,74
						N7_G4	2,94
			Mn <sup>2+</sup> (b)	0,35	26,77	O6_G16	2,57
						N7_G16	3,04

<sup>(a)</sup>  $B_{eq}$

Długość wiązania Mn<sup>2+</sup>–ligand jest generalnie większa dla wcześniej opisanych kompleksów Z-DNA–Mn<sup>2+</sup> w porównaniu z kompleksem d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> (Tabela 26). Różnice w sferach koordynacyjnych jonów Mn<sup>2+</sup> dla struktur zdeponowanych w PDB przez Mandal *i in.*, a d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> mogą być tłumaczone różnym upakowaniem w sieci krystalicznej (Mandal *i in.*, 2012). Zaobserwowano także kilka różnic w konformacji DNA pomiędzy

prezentowanym w tej pracy  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ , a kompleksami Z-DNA- $\text{Mn}^{2+}$  wcześniej zdeponowanymi w PDB. Tak jak w większości przypadków struktur Z-DNA nukleotydy w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  mają konformacje cukrów C2'-*endo* (pirymidyny) i C3'-*endo* (puryny), za wyjątkiem 3'-terminalnych nukleotydów guaninowych (C2'-*endo*). Z drugiej jednak strony, dla wcześniejszych kompleksów Z-DNA- $\text{Mn}^{2+}$  kąty pseudorotacji zawierają się w szerszym zakresie i kilka nukleotydów ma jedną z następujących konformacji: C1'-*exo*, C3'-*exo*, C4'-*exo*, O4'-*exo* lub O4'-*endo* (Mandal *i in.*, 2012). Konformacja Z<sub>II</sub> została zaobserwowana dla kompleksów Z-DNA- $\text{Mn}^{2+}$  nie tylko dla pozycji 4–5 (struktura 3fq5 i omawiany w tej pracy kompleks  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ), ale także pomiędzy nukleotydami 8–9 i 10–11, odpowiednio dla struktur 4dy8 i 4dwy. W przeciwieństwie do wyżej opisanych kompleksów Z-DNA- $\text{Mn}^{2+}$  (w których brak cząsteczki  $\text{Spm}^{4+}$ ), gdzie jon  $\text{Mn}^{2+}$  oddziałuje z dwiema zasadami DNA (nierównocześnie w przypadku struktury 4dy8), dla prezentowanego tutaj kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ , kation  $\text{Mn}^{2+}$  koordynuje tylko do jednej guaniny. Struktury 3fq5, 4dwy i 4dy8 mają duże wartości parametru *x-displacement* (–56,8, 61,3 i –98,0 Å) dla pary nukleotydów, gdzie jon  $\text{Mn}^{2+}$  jest ulokowany pomiędzy tymi zasadami Z-DNA. Tak znaczący efekt odsunięcia zasad od osi helisy nie występuje dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ , gdzie wartości *x-displacement* są w tym samym zakresie, co dla większości struktur  $d(\text{CGCGCG})_2$ .

Położenie kationu sperminy<sup>4+</sup> wzdłuż łańcucha DNA dla kompleksu z  $\text{Zn}^{2+}$  pozwala mu tylko na tworzenie wiązań wodorowych z grupami fosforanowymi. Taka lokalizacja  $\text{Spm}^{4+}$  została jak dotąd zaobserwowana jedynie dla dupleksu  $d(\text{CGT}^{2\text{am}}\text{ACG})_2$ , który wykrystalizował w grupie przestrzennej P3<sub>2</sub>21 (Parkinson *i in.*, 1995). Pomimo tego samego upakowania w kryształach, warunków krystalizacji i sposobu nasączenia, kation  $\text{Spm}^{4+}$  oddziałuje inaczej z Z-DNA w obu opisywanych w tej pracy kompleksach z  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Jak dotąd dla struktur Z-DNA mających typ upakowania A i zawierających tylko jedną cząsteczkę  $\text{Spm}^{4+}$  w części asymetrycznej, nie zaobserwowano tak znacznej różnicy w położeniu  $\text{Spm}^{4+}$  względem DNA. Chociaż zarówno  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  jak i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  otrzymano z zastosowaniem tej samej procedury nasączenia, lokalizacja  $\text{Spm}^{4+}$  w tych strukturach jest różna. Można zatem sądzić, że zmiana położenia jonu sperminy<sup>4+</sup> w komórce elementarnej jest wynikiem odrębności w fizykochemicznych właściwościach danego kationu metalu. Ta hipoteza wymaga dalszych badań z wykorzystaniem innych poliamin biogennych, kationów metali przejściowych, a także prowadzenia eksperymentu w szerszym zakresie pH i stężeń substratów w trakcie krystalizacji i nasączenia.

Prezentowane w tej pracy wyniki dotyczące struktury kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-metal}^{2+}$  potwierdzają, że duplekсы Z-DNA mogą podlegać lokalnym zmianą konformacyjnym, jak sugerowały to już poprzednio badania układów Z-DNA–kation metalu bloku d (Wang *i in.*, 1981; Eichman *i in.*, 1999; Bharanidharam *i in.*, 2007; Mandal *i in.*, 2008). Omawiane tutaj wysokorozdzielcze struktury dostarczają ważnych i dokładnych informacji o parametrach geometrycznych charakteryzujących koordynację biologiczne istotnych kationów metali (także w układach z poliaminami<sup>n+</sup>) przez DNA. Tego typu eksperymenty i analiza ich wyników są etapem do rozwiązania problemów dotyczących oddziaływań kationów organicznych i nieorganicznych z biomakromolekułami *in vivo* (Fraustro da Silva & Williams, 2001).

## V.2 Wyniki badań nad kompleksem $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$

### V.2.1 Jakość wyników

Wyznaczono strukturę kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  udokładnioną z użyciem danych dyfrakcyjnych o rozdzielczości 0,71 Å, uzyskując końcowe  $R$  i  $R_{\text{free}}$  wynoszące odpowiednio 9,01 i 9,43%. Wartości r.m.s.d. (średnie kwadratowe odchylenie) dla nukleotydów DNA pomiędzy strukturą 3p4j (Brzeziński *i in.*, 2011), a przedstawionym w tej rozprawie kompleksem wynoszą 0,477 Å [konformacja I dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ ] i 0,388 Å [konformacja II dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ ]. Wartości r.m.s.d. dla nukleotydów DNA pomiędzy strukturą  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  a kompleksem  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  wynoszą 0,462 Å [konformacja I dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ ] i 0,383 Å [konformacja II dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ ]. Wartości r.m.s.d. dla nukleotydów DNA pomiędzy strukturą  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  a kompleksem  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  wynoszą 0,612 Å (konformacja I dla obu struktur) i 0,592 Å (konformacja II dla obu struktur). Wyznaczone odchylenia standardowe (ang. *estimated standard uncertainties; e.s.u.*) dla całkowicie obsadzonych pozycji atomów DNA dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  zawarte są w przedziale 0,004 – 0,011 Å dla atomów C, 0,004 – 0,007 Å dla atomów N, 0,003 – 0,008 Å dla atomów O, 0,001 – 0,002 Å dla atomów P oraz 0,003 Å dla kationu  $\text{K}^+$ .

### V.2.2 Ogólna struktura i parametry helikalne

Część asymetryczna komórki elementarnej kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ , o typie upakowania A, zawiera duplekisy  $d(\text{CGCGCG})_2$  z numeracją nukleotydów zgodną ze strukturami tego typu wcześniej zdeponowanymi w bazie PDB. Ogólne parametry strukturalne helisy DNA z kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  klasyfikują ją do rodziny dupleksów Z-DNA. Porównanie parametrów helikalnych i geometrii par zasad pomiędzy omawianym tutaj kompleksem  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ , a wcześniej opisanymi jest zawarte w Tabeli 27. Podwójne konformacje grup fosforanowych w strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  są obserwowane dla nukleotydów C3–G4, G4–C5 i C5–G6. Konformacja  $Z_{\text{II}}$  została przypisana tylko alternatywnej pozycji grupy fosforanowej ulokowanej pomiędzy G4(II)–C5(II) ( $\zeta = 64,4^\circ$ ). Stabilizacja konformacji  $Z_{\text{II}}$  zachodzi poprzez wiązania wodorowe atomów tlenu OP1(I)\_C5 i OP2(II)\_C5 z cząsteczkami wody. Dla pozostałych podwójnych konformacji obu wariantom położenia grup fosforanowych można przypisać formę  $Z_{\text{I}}$ . Szerokość małej bruzdy (obliczona wg Stofer & Lavery, 1994; El Hassan & Calladine, 1998; tj. po odjęciu 5,8 Å od promienia dwóch grup fosforanowych) dla par nukleotydów C3G4(I)–C9G10 i C3G4(II)–C9G10 wynosi odpowiednio

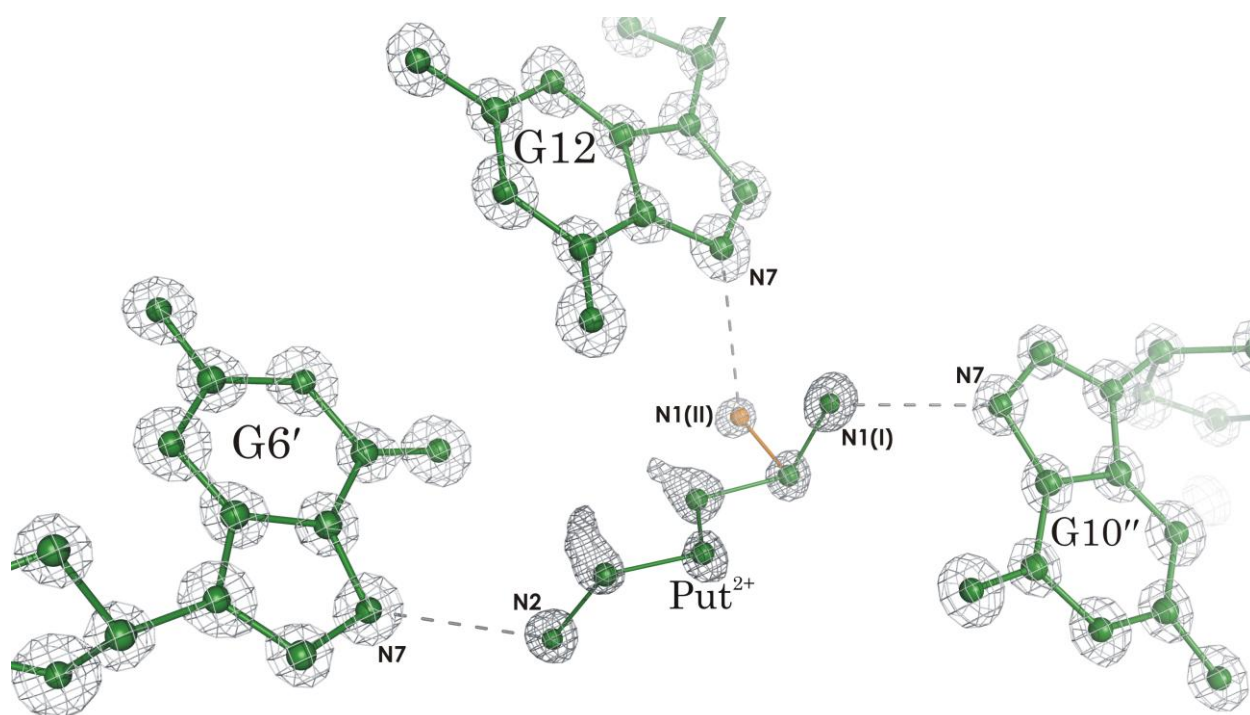
12,2 i 13,1 Å. Pofałdowanie pierścieni deoksyrybozy jest typowe dla dupleksów Z-DNA co ilustruje Tabela 27.

**Tabela 27.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo-fosforanowego dla struktury d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>. Odchylenia standardowe podane są w nawiasach. Wszystkie wartości numeryczne w tabeli podano w stopniach. Amplitudy pofałdowania pierścienia furanozy ( $\tau_m$ ) i kąty fazowe pseudorotacji ( $P$ ) zostały obliczone za pomocą metody Jaskólskiego (1984). Definicje kątów torsyjnych jak w Tabeli 22.

d(CGCGCG) <sub>2</sub> –Put <sup>2+</sup> –K <sup>+</sup>												
Kąt	C1	C3(I) C3(II)	C5(I) C5(II)	C7	C9	C11	G2	G4(I) G4(II)	G6(I) G6(II)	G8	G10	G12
$\alpha$	-	-146,6(2)	-151,0(9) 165,8(6)	-	-147,0(3)	-147,8(3)	65,0(3)	72,3(4) 58(1)	72(1) 79(1)	62,3(3)	66,0(3)	79,1(3)
$\beta$	-	-119,4(3)	-115,4(3) 160,3(3)	-	-124,7(3)	-125,4(3)	-171,1(2)	-173,6(3) -173,1(5)	-179,5(8) -174,4(4)	-171,8(3)	-178,9(2)	-176,7(2)
$\gamma$	54,4(3)	50,9(4)	49,3(4)	53,2(5)	57,4(4)	54,7(3)	176,6(4)	-179,2(8)	-176,4(6) -176,1(9)	176,3(3)	179,7(3)	-175,9(3)
$\delta$	139,6(2)	151,0(4) 133(1)	138,1(4) 152,9(7)	147,5(2)	146,2(3)	138,9(4)	89,8(3)	89(1) 96,3(7)	145,5(4)	92,7(4)	97,0(3)	152,7(3)
$\varepsilon$	-92,1(2)	-98,7(6) -84,1	-90,4(7) -102,9(8)	-89,4(3)	-90,5(3)	-96,4(3)	-121,6(3)	-115,0(1) -179,3(8)	-	-111,5(3)	-116,2(3)	-
$\zeta$	73,6(2)	67,2 73,0	72,2(9) 74(1)	75,2(3)	72,5(3)	66,6(3)	-65,9(3)	-63(2) 64(1)	-	-80,9(4)	-67,0(3)	-
$\chi$	-153,1(2)	-153,1(3)	-147,7(2)	-147,5(2)	-154,8(2)	-154,7(2)	59,4(4)	59,1(4)	78,6(4)	64,6(4)	62,1(4)	76,8(4)
$\nu_0$	-27,5(3)	-24,6(4)	-23,6(3)	-23,3(3)	-20,9(3)	-25,8(3)	-7,7(3)	-3,9(4)	-18,8(3)	-7,0(4)	0,3(3)	-22,4(2)
$\nu_1$	36,2(3)	38,1(4)	34,8(3)	35,1(3)	33,9(3)	35,3(4)	-12,8(3)	-14,9(4)	32,2(3)	-11,6(4)	-17,0(4)	37,9(3)
$\nu_2$	-30,6(3)	-37,1(4)	-32,1(3)	-33,1(3)	-33,5(3)	-31,1(3)	26,5(3)	26,5(4)	-32,4(3)	24,3(4)	25,7(4)	-38,4(3)
$\nu_3$	15,4(3)	23,8(4)	19,1(3)	20,7(3)	22,1(3)	17,0(3)	-31,9(3)	-29,0(4)	22,3(4)	-29,3(4)	-26,2(3)	26,6(3)
$\nu_4$	7,6(3)	0,7(4)	2,8(3)	1,7(3)	-0,6(3)	5,5(3)	25,0(3)	20,6(4)	-2,2(3)	23,3(3)	16,5(3)	-2,9(3)
Parametry pseudorotacji												
$P$	150,0(7)	161,0(7)	157,2(7)	159,0(6)	163,0(7)	153,2(7)	32,0(5)	25,1(5)	165,4(6)	32,0(8)	17,4(7)	165,6(8)
$\tau_m$	36,3(5)	39,9(5)	35,5(5)	36,4(5)	35,8(4)	35,3(4)	32,0(4)	29,7(3)	34,3(4)	29,4(4)	27,7(4)	40,6(5)
	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C3'-endo	C2'-endo

### V.2.3 Oddziaływania kationu putrescyny<sup>2+</sup> z dupleksem d(CGCGCG)<sub>2</sub>

Na mapie gęstości elektronowej zidentyfikowano jedną cząsteczkę putrescyny<sup>2+</sup> w części asymetrycznej komórki elementarnej, oddziałującą z cząsteczkami wody i trzema guaninami (każda z innego duplexu Z-DNA; Rys. 38, Tabela 28). Atom N1\_Put<sup>2+</sup> został wymodelowany w dwóch pozycjach (I i II) mających odpowiednio obsadzenie 0,44 i 0,56. Atomy N7\_G12, N7\_G6<sup>vii</sup> (3/2-x, 1-y, z-1/2) oraz N7\_G10<sup>viii</sup> (1/2-x, 3/2-y, 1-z) to główne miejsca oddziaływania putrescyny<sup>2+</sup> z duplexami Z-DNA. Atom N1\_Put<sup>2+</sup> w konformacji I mostkuje G12<sup>i</sup> i G10<sup>vii</sup>. Atomy azotu putrescyny<sup>2+</sup> tworzą także wiązania wodorowe z cząsteczkami wody (Tabela 28), a te z kolei z atomami DNA. W szczególności istotna jest stabilizacja konformacji Z<sub>II</sub> grupy fosforanowej pomiędzy nukleotydami G4-C5 [N2\_Put<sup>2+</sup>...Woda70...OP1(II)\_C5].



**Rys. 38.** Oddziaływania kationu putrescyny<sup>2+</sup> z atomami N7\_G z trzech odrębnych helis d(CGCGCG)<sub>2</sub>. Mapa gęstości elektronowej 2*Fo*-*Fc*, kontur 1,4σ dla Put<sup>2+</sup> oraz 3σ dla nukleotydów DNA.

**Tabela 28.** Wiązania wodorowe kationu putrescyny<sup>2+</sup> i jego kąty torsyjne (°) w kompleksie d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>. Odchylenia standardowe podane są w nawiasach. Odległości podano w Å.

Atom putrescyny <sup>2+</sup>					
N1(I)		N1(II)		N2	
Wiązanie wodorowe	Długość	Wiązanie wodorowe	Długość	Wiązanie wodorowe	Długość
N7_G12	2,920()	N7_G12	2,858()	N7_G6 <sup>vii</sup>	2,798()
N7_G10 <sup>viii</sup>	2,775()	Woda31	3,078()	Woda140	2,857()
Woda119a	2,927()	Woda91	2,887()	Woda144	3,017()
Kąty torsyjne					
N1(I) - C2 - C3 - C4		–73(1)		<i>gauche</i>	
N1(II) - C2 - C3 - C4		–165,21(98)		<i>trans</i>	
C1 - C2 - C3 - C4		174,55(96)		<i>trans</i>	
C2 - C3 - C4 - N2		70(1)		<i>gauche</i>	

#### V.2.4 Oddziaływania kationu K<sup>+</sup> w układzie d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>

W początkowych etapach udokładniania przyjęto, że w oddziaływaniach z kompleksem d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> w sąsiedztwie grup fosforanowych G6 i G8<sup>v</sup> biorą udział tylko cząsteczki wody. Jednakże dodatnia gęstość elektronowa mapy *Fo–Fc* (~7,5σ) oraz wysoki pik (~12,6σ) na anomalnej mapie różnicowej zbiegający się z pozycją cząsteczki wody skłoniły do szczególnego zwrócenia uwagi na ten fragment struktury (Rys. 39 i 40). W rozważaniach uwzględniono możliwość wbudowania w tej pozycji kationów z układu krystalizacyjnego. Przy długości fali zastosowanej w eksperymencie dyfrakcyjnym (0,827 Å) wyznaczone wartości poprawki urojonej (*f'*) czynnika rozpraszania dla atomów Na i K wynoszą odpowiednio 0,034 i 0,344 jednostki elektronowej. Otrzymane dane wskazują jednoznacznie, że sygnał anomalny pochodzić może tylko od K<sup>+</sup>. Przeprowadzono także analizę parametrów walencyjności wiązań. Równanie (4) przedstawia związek pomiędzy walencyjnością wiązania (*v<sub>pz</sub>*) o długości *d<sub>pz</sub>* pomiędzy atomami *p* i *z* (Brese & O'Keefe, 1991).



$$v_{pz} = \exp[(R_{pz} - d_{pz})/b] \quad (4)$$

gdzie:

$R_{pz}$  – parametr walencyjności wiązania

$b$  – stała wynosząca 0,37

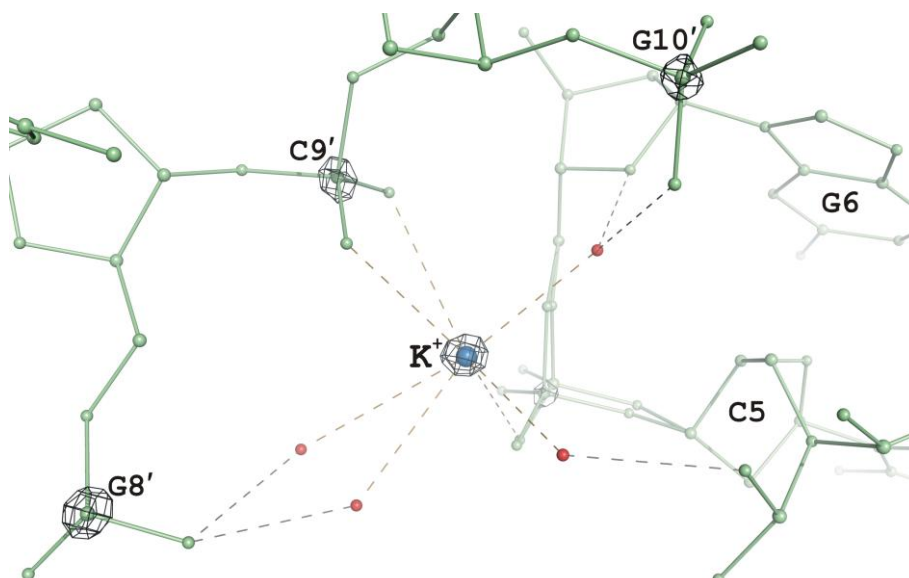
Korzystając z wzoru 4 przeprowadzono obliczenia dla dwóch potencjalnych kationów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  mających walencyjność równą 1. Dane zawarte w Tabeli 29 wskazują jednoznacznie, że to kation  $\text{K}^+$  (a nie  $\text{Na}^+$ ) jest zlokalizowany pomiędzy grupami fosforanowymi G6 i C9<sup>v</sup>. Po uwzględnieniu jonu  $\text{K}^+$ , mapa  $Fo-Fc$  nie zawierała już wartości dodatnich i następowała jednoczesna poprawa wskaźników rozbieżności  $R$  i  $R_{\text{free}}$ .

**Tabela 29.** Walencyjność  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  obliczona na podstawie parametrów walencyjności wiązań  $\text{metal}^{n+}$ –ligand.

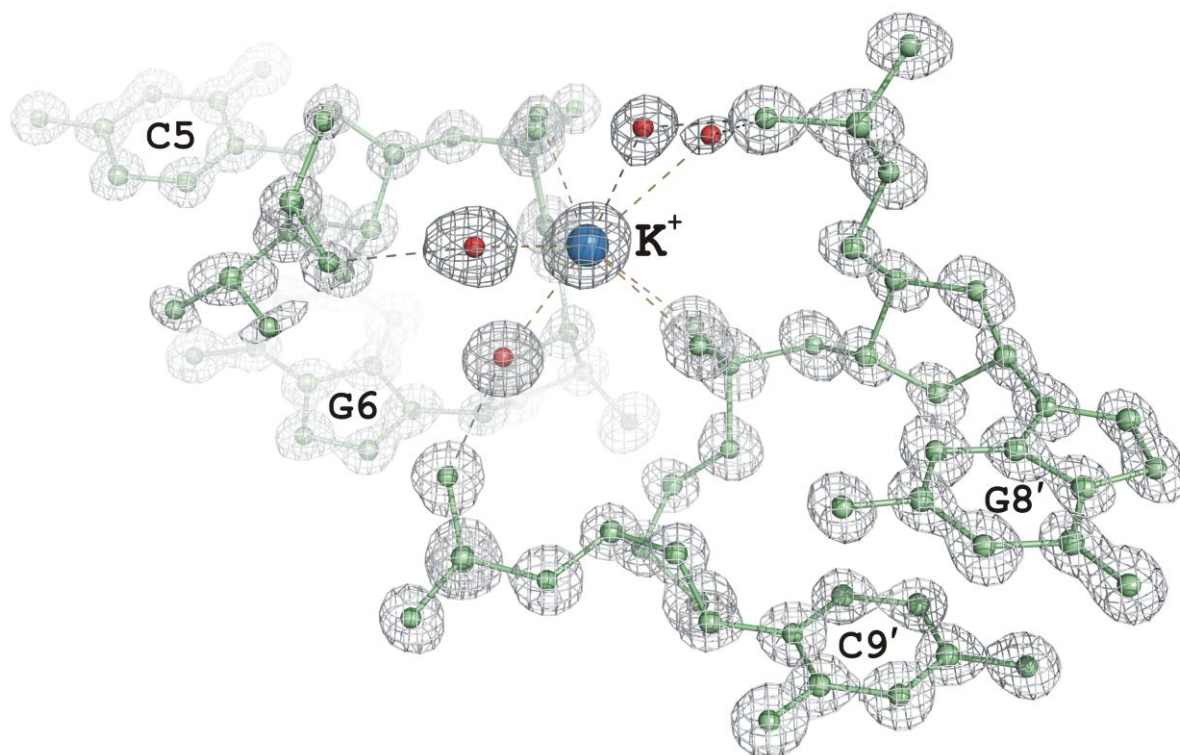
Atom tlenu	$v_{pz}$ dla $\text{Na}^+$	$v_{pz}$ dla $\text{K}^+$
Woda10	0,103	0,251
Woda79a	0,060	0,143
Woda79b	0,036	0,055
Woda146	0,075	0,209
OP1(I)_G6	0,101	0,221
OP1_C9 <sup>v</sup>	0,031	0,072
OP2_C9 <sup>v</sup>	0,075	0,186
<b>Suma <math>v_{pz}</math></b>	0,466	1,138

<sup>(a)</sup> Wykazujące nieuporządkowanie cząsteczki wody 79a i 79b mają prawdopodobieństwo obsadzenia odpowiednio 0,52 i 0,48.

Odległości  $\text{K}^+ - \text{O}$  (atomy tlenu z grup fosforanowych i cząsteczek  $\text{H}_2\text{O}$ ) zawierają się w przedziale od 2,641(5) do 3,20(3) Å (Tabela 30, Rys. 40). Cząsteczki wody, należące do sfery koordynacyjnej  $\text{K}^+$ , stabilizują poprzez wiązania wodorowe pozycje grup fosforanowych w konformacji  $Z_I$ , w szczególności pomiędzy nukleotydami G4–C5 [ $\text{K}^+ - \text{Woda146} \cdots \text{OP1(I)}_C5$ ]. Lokalizacja poszczególnych ligandów wokół  $\text{K}^+$  jest dobrze zdefiniowana na mapie gęstości elektronowej, a kompleks ten posiada geometrię zdeformowanego oktaedru.



**Rys. 39.** Anomalna mapa różnicowa dla kationu  $K^+$  ( $f'' = 0,344$ ) oraz atomów fosforu ( $f'' = 0,129$ ) z nukleotydów DNA, kontur  $6,0\sigma$ .



**Rys. 40.** Otoczenie koordynacyjne jonu  $K^+$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$  ma kontur  $1\sigma$  dla  $K^+$  i cząsteczek wody (czerwone kule), a dla nukleotydów DNA ma kontur  $2\sigma$ .

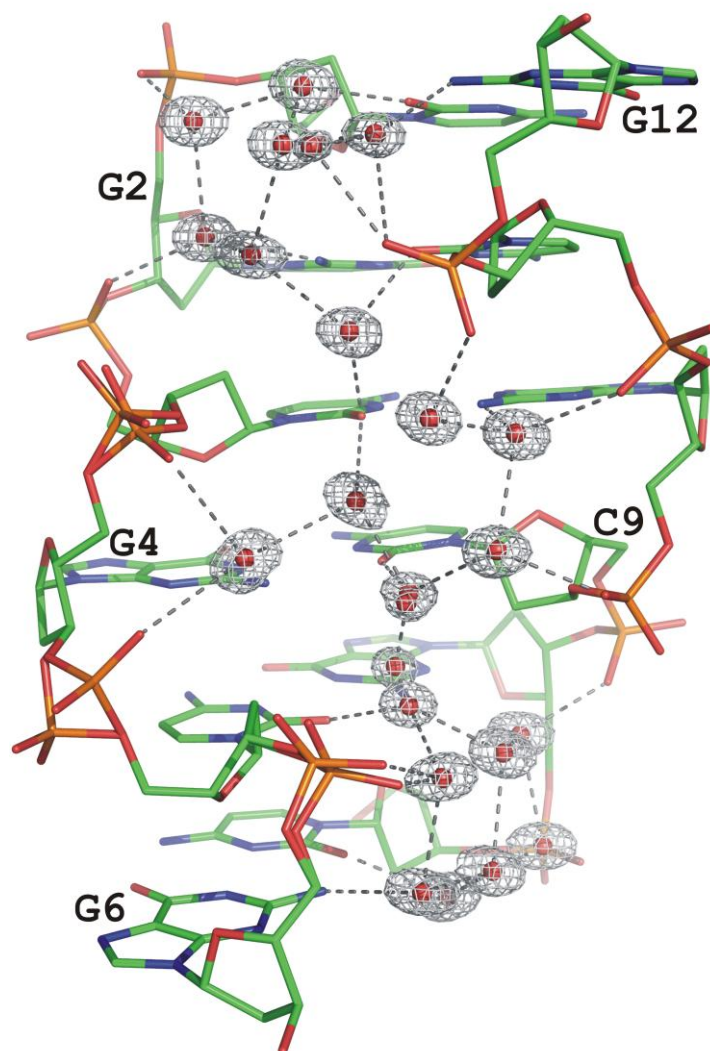
**Tabela 30.** Geometria sfery koordynacyjnej (Å, °) kationu potasu w strukturze d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>. Odchylenia standardowe podane są w nawiasach.

	Odległość			Kąty			
Woda10	2,641(5)						
Woda79a <sup>(a)</sup>	2,85(1)	152,9(4)					
Woda79b <sup>(a)</sup>	3,20(3)	170,5(4)	31,5(5)				
Woda146	2,71(1)	76,6(3)	79,6(4)	108,6(5)			
OP1(I)_G6	2,688(7)	108,2(2)	84,8(5)	79,9(3)	92,5(4)		
OP1_C9 <sup>v</sup>	3,104(4)	81,8(1)	120,5(3)	90,7(4)	152,2(3)	110,9(2)	
OP2_C9 <sup>v</sup>	2,752(5)	89,2(2)	93,9(3)	81,5(3)	110,0(3)	153,8(2)	51,0(1)
	K <sup>+</sup>	Woda10	Woda79(I)	Woda79(II)	Woda146	OP1(I)_G6	OP1_C9 <sup>v</sup>

<sup>(a)</sup> Wykazujące nieuporządkowanie cząsteczki wody 79a i 79b mają obsadzenia odpowiednio 0,52 i 0,48.

### V.2.5 Hydratacja

Kompleks d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> wykazuje podobieństwo do innych wysokorozdzielczych struktur Z-DNA pod względem architektury sfery hydratacyjnej, zawierającej rozwiniętą sieć wiązań wodorowych stabilizujących upakowanie cząsteczek w kryształach. Część asymetryczna komórki elementarnej zawiera 110 cząsteczek wody. Całkowity współczynnik obsadzenia ma 18 cząsteczek wody. Liczba bliskich par cząsteczek wody (odległość < 2,3 Å) wynosi 15. Kompleks d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> charakteryzują takie cechy architektury hydratacyjnej dla kryształów Z-DNA jak spin hydratacji (pojęcie spinu hydratacji wyjaśnione zostało w publikacji Chevriera *i in.*, 1986), pozycje cząsteczek wody pomiędzy grupami N2\_G a atomami tlenami grup fosforanowych oraz brak cząsteczek wody oddziałujących z atomami N3\_G (Rys. 41). W sposób charakterystyczny dla podobnych układów dwie cząsteczki wody tworzą wiązania wodorowe z O6\_G. Ponadto cząsteczki wody mostkują guaniny z przeciwnych łańcuchów DNA, O6\_G2···Woda210···O6\_G10 oraz O6\_G4···Woda233···O6\_G8.



**Rys. 41.** Hydratacja małej bruzdy DNA kompleksu z  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$  dla cząsteczek wody, kontur  $1\sigma$ .

#### V.2.6 Dyskusja wyników dla kompleksu $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$

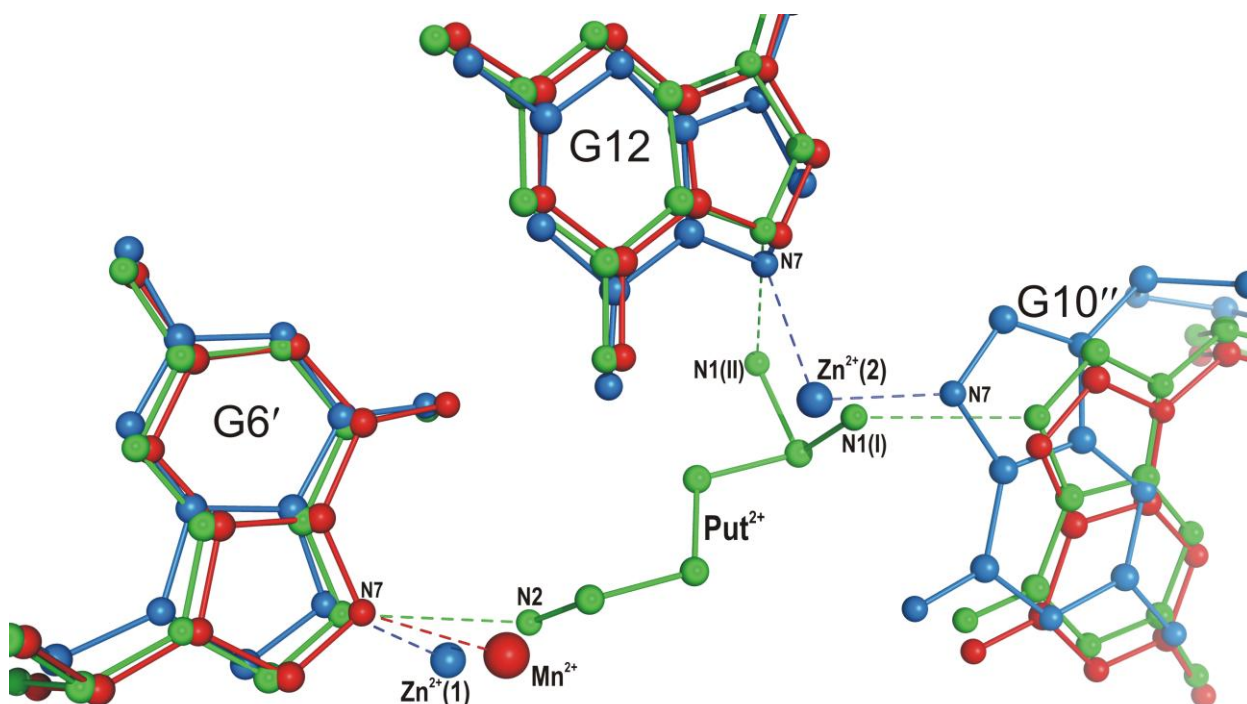
Jak wiadomo putrescyna<sup>2+</sup> (amina biogenna) oddziałuje z DNA i jest zaangażowana w proliferację komórek podczas jego replikacji (Pospieszna-Markiewicz *i in.*, 2007). Mimo to, uwzględniając znaczenie tego procesu, w bazie PDB nie ma struktur kompleksów kwas nukleinowy–putrescyna<sup>2+</sup>, brak także danych literaturowych.

Niniejsze badania wykazały, że kation putrescyny<sup>2+</sup>, pomimo krótszego w porównaniu ze sperminą<sup>4+</sup> łańcucha alifatycznego, tworzy liczne wiązania wodorowe z cząsteczkami wody i egzocyklicznymi atomami O6 i N7 guanin, należących do trzech różnych helis  $d(\text{CGCGCG})_2$ . Obserwacja ta potwierdza efektywność i rolę putrescyny<sup>2+</sup> w stabilizacji struktury i upakowania (typu A) Z-DNA. Podobnie jak spermina<sup>4+</sup>, jon putrescyny<sup>2+</sup> wykazuje tendencję do przyjmowania podwójnych konformacji.

Chociaż układy krystalizacyjne dla wszystkich omawianych w tej pracy kompleksów Z-DNA zawierały KCl w stężeniu 40 mM w kropli krystalizacyjnej, to tylko dla struktury Z-DNA z putrescyną<sup>2+</sup> zidentyfikowano kation K<sup>+</sup> na mapach gęstości elektronowej. Podkreślić należy, że oddziaływanie Z-DNA–K<sup>+</sup> nie zostało dotąd opisane w literaturze dotyczącej badań krystalograficznych nad strukturami Z-DNA. Ostateczna identyfikacja kationu potasu w strukturze dyskutowanego kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> dokonana została na podstawie analizy map gęstości elektronowej, obrazu jego sfery koordynacyjnej, parametrów walencyjności wiązań oraz anomalnej mapy różnicowej. Kation K<sup>+</sup> w kompleksie d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> oddziałuje z atomami OP1\_G6 i OP2\_C9<sup>v</sup>, to jest z tymi samymi atomami, które tworzą wiązanie z atomem N1\_Spm<sup>4+</sup> w kompleksach d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> i d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>. Taka obecność kationu potasu w pobliżu grup fosforanowych G6 i C9<sup>i</sup> wskazuje na specyficzność i rolę tego miejsca dla struktury i upakowania dupleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>. Udział K<sup>+</sup> i Put<sup>2+</sup> nie wystarcza do stabilizacji konformacji Z<sub>II</sub> dla G4–C5, odwrotnie niż to zaobserwowano w układach z d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> i d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> (brak podwójnej konformacji G4–C5). Wyniki powyższej analizy są przykładem relacji między kationami organicznymi i nieorganicznymi w układach biologicznych, szczególnie w aspekcie różnic w ładunku i rozmiarze obu rodzajów kationów.

Różnice w ładunkach sperminy<sup>4+</sup> i putescyny<sup>2+</sup> oraz długości ich alifatycznych łańcuchów rzutują na odmienność schemat oddziaływań obu poliamin<sup>n+</sup> z Z-DNA w strukturach dyskutowanych w tej pracy kompleksów. Porównanie lokalizacji poliamin<sup>n+</sup> względem Z-DNA w komórkach elementarnych kompleksów d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup>, d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> oraz d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> (Tabele 25 i 28, Rys. 34, 35 i 38), wykazuje zróżnicowanie kontaktów międzycząsteczkowych dupleksów Z-DNA z sperminą<sup>4+</sup> i z putrescyną<sup>2+</sup>. Chociaż kompleks d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>, podobnie jak to zostało stwierdzone dla wcześniej omawianych tutaj struktur d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> i d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>, ma typ A upakowania, to jednak putrescyna<sup>2+</sup> w przeciwieństwie sperminy<sup>4+</sup> wiąże się z innymi fragmentami dupleksów Z-DNA.

Interesującą obserwacją jest również fakt, że lokalizacja atomów N1 i N2 cząsteczek putescyny<sup>2+</sup> w komórce elementarnej kompleksu d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> jest analogiczna z pozycjami kationów, odpowiednio Mn<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>(1) oraz Zn<sup>2+</sup>(2) (Rys. 41). Putrescyna<sup>2+</sup> mając taki sam ładunek jak Mn<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> może zatem efektywnie zastępować te kationy w oddziaływaniach z Z-DNA



**Rys. 41.** Kompleksy  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  (czerwony),  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  (niebieski) i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  (zielony) w ich wspólnym układzie współrzędnych. Przedstawiono oddziaływania jonów  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}(1)$ ,  $\text{Zn}^{2+}(2)$  i atomów azotu putrescyny<sup>2+</sup> z  $\text{N7\_G12}$ ,  $\text{N7\_G6}^{\text{vii}}$  oraz  $\text{N7\_G10}^{\text{viii}}$ . Widoczne jest także odmienne położenie  $\text{G10}^{\text{viii}}$  w kompleksie z kationami  $\text{Zn}^{2+}$ .

### V.3 Wyniki badań nad kompleksem $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$

#### V.3.1 Ogólna struktura i parametry helikalne

Część asymetryczna komórki elementarnej kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  zawiera dupleks  $d(\text{CGCGCG})_2$ , u którego zastosowano numerację nukleotydów taką jak dla dyskutowanych poprzednio kompleksów z  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ . Ogólne parametry strukturalne helisy DNA z kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  klasyfikują ją do rodziny dupleksów Z-DNA. Porównanie parametrów helikalnych i geometrii par zasad pomiędzy omawianym tutaj kompleksem  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ , a wcześniej opisanymi jest zawarte w Tabeli 31. Cechą charakterystyczną kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  jest wysoki stopień nieuporządkowania łańcucha DNA. Podwójne konformacje grup fosforanowych obserwowane są dla nukleotydów G2–C3, C3–G4, G4–C5, C5–G6, G8–C9 oraz G10–C11. W szczególności mapa gęstości elektronowej dla nukleotydu G2 wyraźnie wykazała alternatywne pozycje dla pierścienia zasady i deoksyrybozy (Rys. 42). Długości wiązań wodorowych dla obu par G2(I)·C11 i G2(II)·C11 różnią się od typowych długości odpowiadających komplementarnej parze zasad G·C typu Watsona–Cricka ( $\text{O6}\cdots\text{N4}$  2,86 Å,  $\text{N1}\cdots\text{N3}$  2,91 Å,  $\text{N2}\cdots\text{O2}$  2,86 Å; Guerra *i in.*, 2000). W strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  dla pary G2(I)·C11 wiązania te są dłuższe ( $\text{N2}\cdots\text{O2}$  3,01 Å,  $\text{N1}\cdots\text{N3}$  3,23 Å,  $\text{O6}\cdots\text{N4}$  3,32 Å), natomiast dla G2(II)·C11 są one krótsze ( $\text{N2}\cdots\text{O2}$  2,76 Å,  $\text{N1}\cdots\text{N3}$  2,74 Å,  $\text{O6}\cdots\text{N4}$  2,60 Å). Konformacje G2(I) i G2(II) różnią się wartościami kąta pseudorotacji ( $P$ ) wynoszącego odpowiednio 332,0° ( $\text{C2}'\text{-exo}$ ) oraz 40,2° ( $\text{C4}'\text{-exo}$ ). Pozostałe konformacje cukrów są typowe dla Z-DNA ( $\text{C2}'\text{-endo}$ /pirymidyny i  $\text{C3}'\text{-endo}$ /puryny), poza nukleotydami na końcach 3' (G6 i G12) mającymi konformację  $\text{C2}'\text{-endo}$  (efekt 3'-terminalnego nukleotydu guanozyny; Gessner *i in.*, 1989; Harper *i in.*, 1998). Nieuporządkowane grupy fosforanowe mają konformację  $Z_I$  i  $Z_{II}$  dla pozycji alternatywnych. Konformacja  $Z_{II}$  została przypisana fragmentom nukleotydów G2(II) ( $\zeta = 69,1^\circ$ ), G4(II) ( $\zeta = 46,1^\circ$ ), G8(II) ( $\zeta = 55,0^\circ$ ) oraz G10(I) ( $\zeta = 65,3^\circ$ ). Konformacje  $Z_{II}$  stabilizowane są przez wiązania wodorowe między tlenami grup fosforanowych, a cząsteczkami wody wchodzącymi w skład sfery koordynacyjnej kationów  $\text{Cr}^{3+}$  oraz kontakty z symetrycznie równoważnymi helisami Z-DNA w sieci krystalicznej.

**Tabela 31.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo-fosforanowego dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Wszystkie wartości numeryczne w tabeli podano w stopniach. Amplitudy pośladowania pierścienia furanozy ( $\tau_m$ ) i kąty fazowe pseudorotacji ( $P$ ) zostały obliczone za pomocą programu 3DNA (Lu & Olson, 2003). Definicje kątów torsyjnych jak w Tabeli 22.

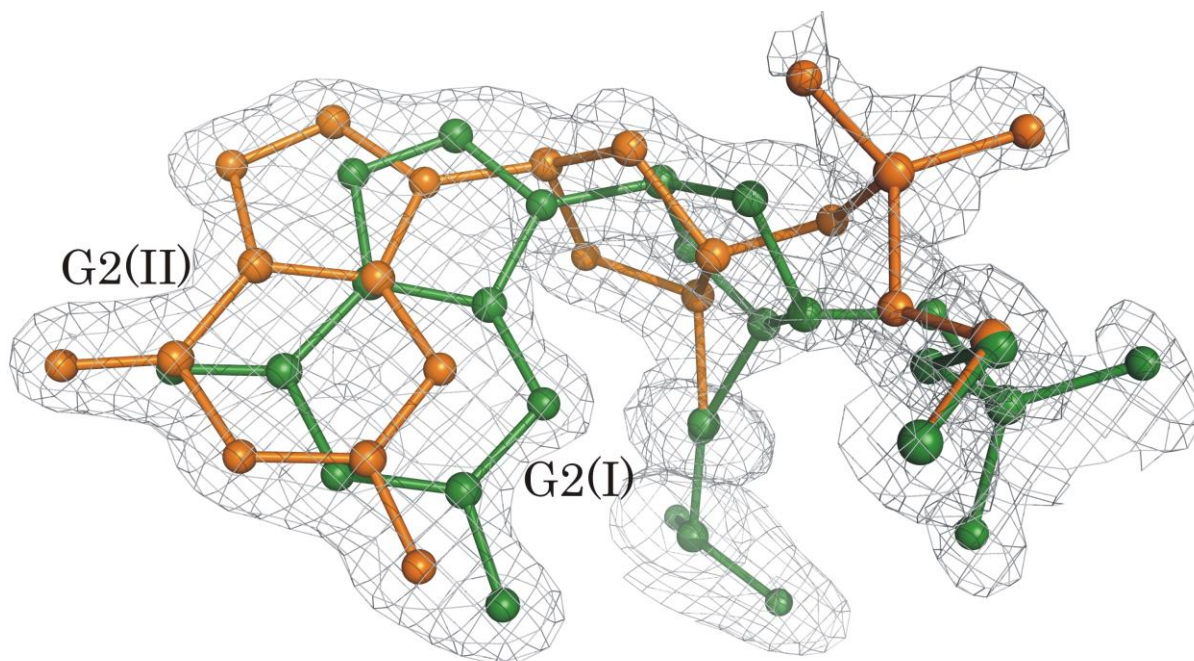
$d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$												
Kąt	C1	C3(I) C3(II)	C5(I) C3(II)	C7(I)	C9(I) C9(II)	C11	G2(I) G2(II)	G4(I) G4(II)	G6	G8(I) G8(II)	G10(I) G10(II)	G12(I)
$\alpha$	-	-137,7 158,5	-155,2 166,7	-	-149,1 162,8	170,8 -155,5	56,4	83,9 57,8	92,6	64,3	70,7	84,4
$\beta$	-	-126,1 144,0	-121,4 170,0	-	-129,9 164,2	148,7 -167,8	153,0 -172,3	-178,0 -172,0	178,2	-177,1	-169,0	-178,8
$\gamma$	54,6	35,6 59,8	55,0	50,0	59,1	48,3	-164,9 -173,2	-178,4	-177,4	177,1	-178,6	-173,3
$\delta$	141,1	138,3 141,0	143,9	138,6	149,3	138,7	115,9 96,8	88,3 93,4	145,6	94,8	93,3	152,3
$\varepsilon$	-92,5	-89,3 -96,6	-95,0	-92,6	-97,6	-98,2	-129,5 -176,0	-115,0 -177,7	-	-111,4 179,0	-167,1 -124,8	-
$\zeta$	77,0	55,8 82,7	64,7	76,7	77,1	62,1	-51,9 69,1	-68,1 46,1	-	-73,7 55,0	65,3 -17,1	-
$\chi$	-154,9	-156,0	-155,6	-151,9	-158,7	-152,8	69,0 53,8	59,9	69,5	62,3	54,9	71,9
$\nu_0$	-26,0	-27,8	-26,1	-26,7	-23,5	-32,4	13,5 -10,8	-5,5	-23,5	-4,5	-8,4	-22,0
$\nu_1$	38,2	37,6	39,6	35,9	38,6	41,2	-19,0 -6,3	-10,6	38,8	-11,3	-9,0	38,8
$\nu_2$	-35,4	-32,5	-37,2	-31,4	-38,3	-34,1	15,9 20,2	21,4	-37,9	21,5	21,6	-40,4
$\nu_3$	21,4	17,6	23,1	16,6	25,8	16,6	-9,2 -25,2	-25,8	25,4	-24,8	-27,2	28,0
$\nu_4$	2,8	6,4	1,8	6,1	-1,5	9,4	-2,6 22,9	20,1	-1,4	18,6	22,8	-3,9



**Tabela 31. cd.** Kąty torsyjne cukrów i szkieletu cukrowo-fosforanowego dla struktury  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ .

Parametry pseudorotacji												
$P$	157,3	151,6	158,8	151,6	163,6	147,7	332,0	31,8	163,1	29,0	36,7	166,9
							40,2					
$\tau_m$	38,4	37,0	39,9	35,6	39,9	40,3	18,0	25,2	39,6	24,6	26,9	41,5
							26,5					
	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-endo	C2'-exo	C3'-endo	C2'-endo	C3'-endo	C4'-exo	C2'-endo
							C4'-exo					

Obecność podwójnej konformacji nukleotydu G2 w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  powoduje, że obserwowane są wyraźne różnice w wartościach parametrów helikalnych zarówno dla par nukleotydów C1G2–C11G12 i G2C3–G10C11, jak i wartościach średnich dla całego duplexu. Najwyraźniejsze różnice są widoczne w wartościach parametrów *x-displacement*, *tip* i *inclination* (Lu & Olson, 2003) (Tabela 21). Wartości *x-displacement* wynoszą odpowiednio – 34,27 oraz –47,74 Å dla par nukleotydów [C1G2(I)–C11(I)G12] i [C1G2(II)–C11(II)G12].

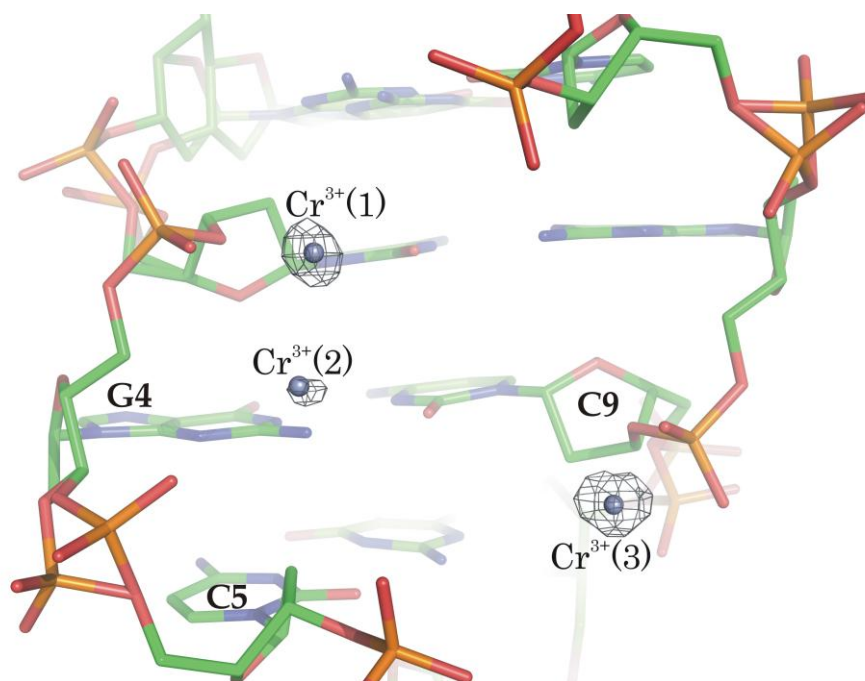


**Rys. 42.** Podwójna konformacja I (zielona) i II (pomarańczowa) nukleotydu G2 w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$  ma kontur  $1\sigma$ .

Różnica w szerokości małej bruzdy (obliczona wg Stofer & Lavery, 1994; El Hassan & Calladine, 1998; tj. po odjęciu 5,8 Å od promienia dwóch grup fosforanowych) pomiędzy konformacjami  $Z_I$  (6,4 Å) i  $Z_{II}$  (6,7 Å) dla pary nukleotydów C3G4–C9G10 w kompleksie  $d(CGCGCG)_2-Cr^{3+}$  jest mniejsza o 0,6 Å w porównaniu do kompleksu z  $d(CGCGCG)_2-Put^{2+}-K^+$ .

### V.3.2 Koordynacja kationów $Cr^{3+}$ i upakowanie w sieci krystalicznej

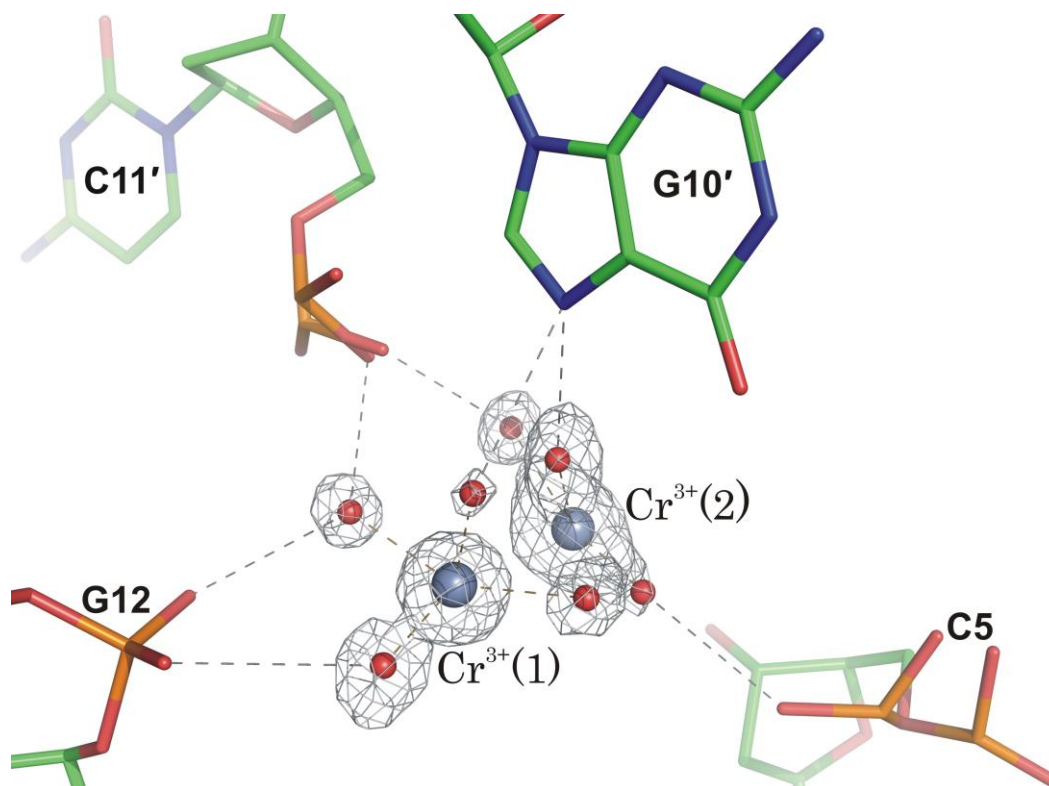
Kryształy duplexu  $d(CGCGCG)_2-Cr^{3+}$  zostały otrzymane przez nasączaanie kationami  $Cr^{3+}$  kryształów  $d(CGCGCG)_2-Spm^{4+}$ . Położenia trzech kationów  $Cr^{3+}(1)$ ,  $Cr^{3+}(2)$  i  $Cr^{3+}(3)$  na mapach  $Fo-Fc$  i  $2Fo-Fc$  są zbieżne z obrazem anomalnej mapy różnicowej (piki o wysokości 15,5 $\sigma$ , 6,7 $\sigma$ , 14,1 $\sigma$ ) (Rys. 43).



**Rys. 43.** Anomalna mapa różnicowa dla kompleksu  $d(CGCGCG)_2-Cr^{3+}$ , kontur 5,5 $\sigma$ .

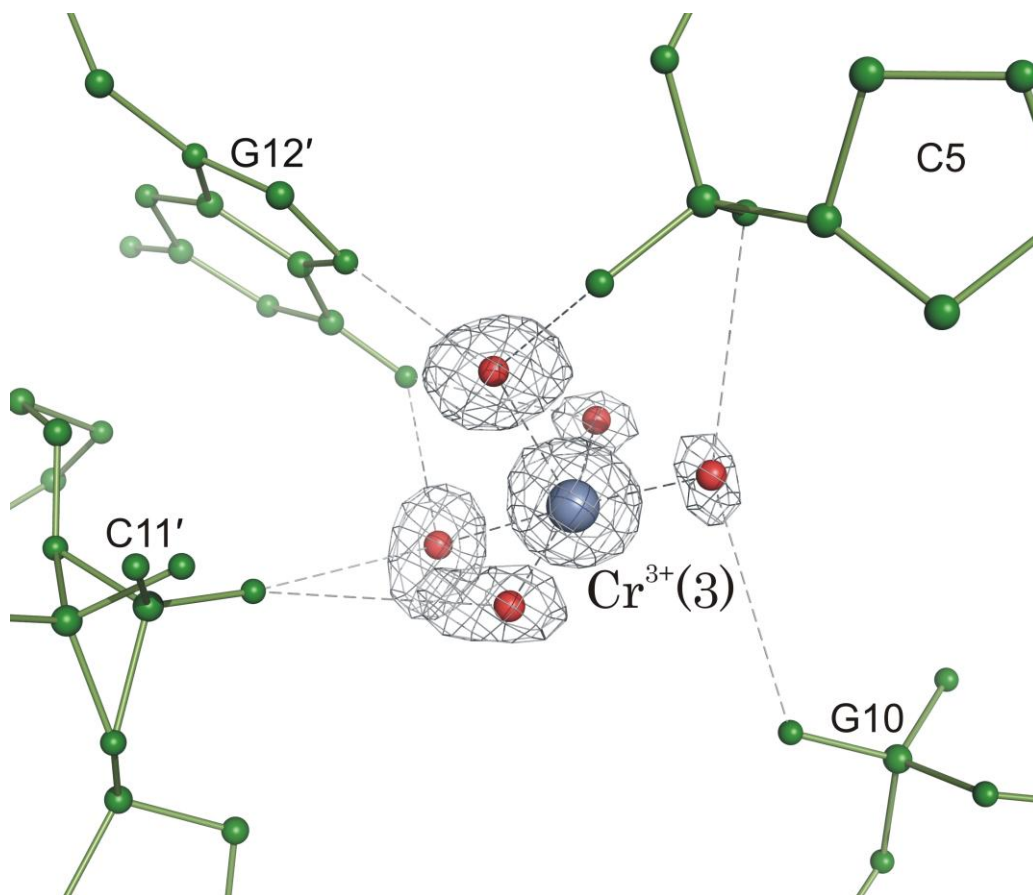
Przy długości fali zastosowanej w eksperymencie dyfrakcyjnym (0,918 Å), wartość poprawki urojonej ( $f''$ ) czynnika rozpraszania dla atomu Cr wynosi 1,028 jednostki elektronowej. Po analizie anomalnej mapy różnicowej i mapy  $Fo-Fc$ , przyjęto, że kationy  $Cr^{3+}(1)$  i  $Cr^{3+}(2)$ , oddległe o 2,41 Å, traktowane będą jako indywidualne jony i udokładniano je niezależnie (Rys. 44). Założenie to potwierdziły także wyższe wartości  $R_{free}$  dla modelu w którym suma wartości obsadzenia jonów  $Cr^{3+}(1)$  i  $Cr^{3+}(2)$ , wynosiła 1,0.

Obsadzenia dla kationów chromu (1) i (2), wynoszące odpowiednio 0,4 i 0,3, ustalono na podstawie mapy  $F_o - F_c$  i wartości czynników temperaturowych  $B$ . Kształt sfery koordynacyjnej  $\text{Cr}^{3+}(1)$ , na którą składają się cztery cząsteczki wody, jest trudny do zdefiniowania i co najwyżej może być rozpatrywany jako silnie zniekształcony tetraedr. Z kolei trzy cząsteczki wody w otoczeniu jonu  $\text{Cr}^{3+}(2)$  przyjmują trójkątną geometrię sfery koordynacyjnej, która przestrzeń podobna jest do kształtu litery T (Tabela 32).



**Rys. 44.** Sfera koordynacyjna kationów  $\text{Cr}^{3+}(1)$  i  $\text{Cr}^{3+}(2)$ . Mapa gęstości elektronowej  $2F_o - F_c$ , kontur  $1\sigma$ .

Podobnie jak w przypadku dwóch wcześniej diskutowanych jonów chromu, kation  $\text{Cr}^{3+}(3)$  nie koordynuje bezpośrednio do żadnego atomu kwasu nukleinowego. Sferze koordynacyjnej kationu  $\text{Cr}^{3+}(3)$ , w której skład wchodzi pięć cząsteczek wody, można przypisać kształt piramidy tetragonalnej. Długości wiązań  $\text{Cr}^{3+}(3)\text{-H}_2\text{O}$  zawarte są w przedziale od 1,85 do 2,15 Å. Wartości kątów w sferze koordynacyjnej  $\text{Cr}^{3+}(3)$  wynoszą od 78,69 do 95,88° oraz 167,68 i 171,06° w podstawie piramidy. Cząsteczki wody jako ligandy  $\text{Cr}^{3+}(3)$  tworzą wiązania wodorowe z atomami OP1\_G6 (3,21 Å), OP2\_G6 (3,18 Å), Å OP2\_G10 (3,42 Å), OP1(I)\_C11<sup>ix</sup> ( $x-1/2, 3/2-y, 1-z$ ) (2,63 Å), a także O6 i N7 guaniny G12<sup>ix</sup> (2,80 i 2,49 Å) z symetrycznie równoważnej cząsteczki (Tabela 32, Rys. 45). Odległości  $\text{Cr}^{3+}(3)$  do  $\text{Cr}^{3+}(1)$  i  $\text{Cr}^{3+}(2)$  wynoszą odpowiednio 7,01 i 6,02 Å.



**Rys. 45.** Sfera koordynacyjna kationu  $\text{Cr}^{3+}(3)$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

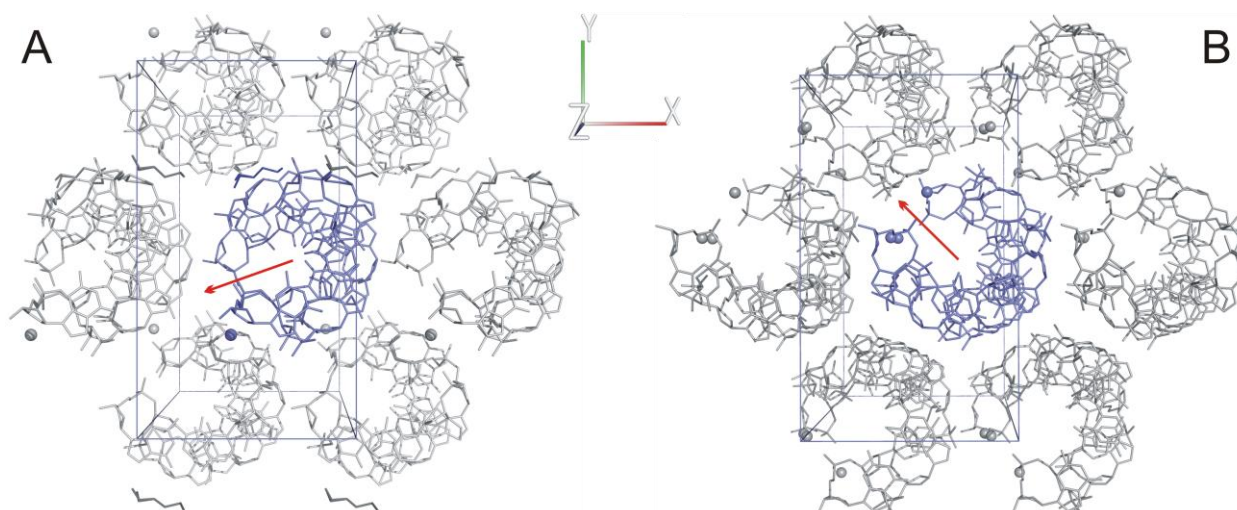
**Tabela 32.** Geometria sfer koordynacyjnych ( $\text{\AA}$ ,  $^\circ$ ) kationów chromu w strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ .

Odległość		Kąty			
Woda36	1,75				
Woda45	1,92	94,24			
Woda59	2,08	98,75	150,87		
Woda60	1,97	91,84	89,28	64,45	
$\text{Cr}^{3+}(1)$		Woda36	Woda45	Woda59	
Odległość		Kąty			
Woda44	2,24				
Woda48	1,65	166,51			
Woda49	1,81	92,99	84,12		
$\text{Cr}^{3+}(2)$		Woda44	Woda48		
Odległość		Kąty			
Woda15	2,01				
Woda38	1,86	94,17			
Woda41	2,15	92,51	171,06		
Woda42	2,00	89,48	95,88	90,10	
Woda43	1,85	85,96	95,86	78,69	167,68
$\text{Cr}^{3+}(3)$		Woda15	Woda38	Woda41	Woda42



Cząsteczki wody ze sfer hydratacyjnych jonów chromów w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  tworzą liczne wiązania wodorowe z atomami tlenu grup fosforanowych oraz atomami N7 nukleotydów  $\text{G10}^x$  ( $x=1, y, z$ ) i  $\text{G12}^{ix}$ . W szczególności należy zaznaczyć fakt pośredniego oddziaływania hydratowanych kationów  $\text{Cr}^{3+}$  z grupami fosforanowymi DNA mającymi podwójne konformacje (Rys. 44 i 45).

W przeciwieństwie do omawianych wcześniej kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  prezentowany tutaj kompleks ma typ upakowania B (Rys. 46).

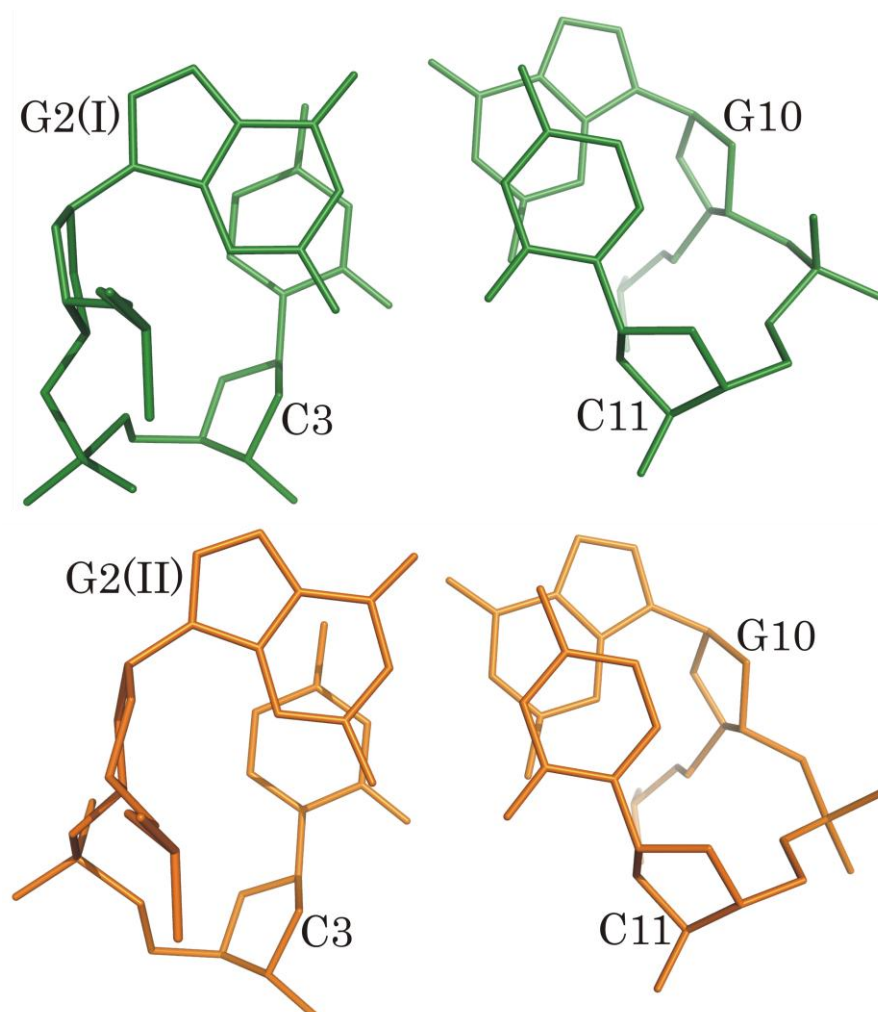


**Rys. 46.** Dwa typy upakowania cząsteczek Z-DNA w komórce elementarnej o symetrii  $P2_12_12_1$  na przykładzie kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  (typ A) i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  (typ B).

### V.3.3 Oddziaływania warstwowe

Z wyjątkiem pary  $\text{G2}\cdot\text{C11}$  w strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ , dla wszystkich innych opisywanych w tej pracy kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-poliamina}^{n+}\text{-metal}^{m+}$  pierścienie zasad mają typowy dla Z-DNA schemat oddziaływań warstwowych. W przypadku kompleksu z jonami  $\text{Cr}^{3+}$  dla pary  $\text{G2}\cdot\text{C11}$  zaobserwowano najistotniejsze różnice w oddziaływaniach tego typu [mierzone powierzchnią ( $\text{\AA}^2$ ) pokrywania się par zasad] w porównaniu z wartościami obliczonymi dla innych dupleksów o sekwencji  $d(\text{CGCGCG})_2$  (Rys. 47). Powierzchnia nakładania się pierścienia zasady G2 (wraz z egzocyklicznymi atomami azotu i tlenu) w konformacji I i II nad zasadą C3 wynosi odpowiednio  $6,16 \text{ \AA}^2$  i  $4,02 \text{ \AA}^2$ . Dla wcześniej omawianych w tej pracy kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  i  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  analogiczne wartości wynoszą odpowiednio  $4,36$ ,  $5,24$  i  $4,76 \text{ \AA}^2$ .

Powierzchnie pokrycia, dla obu (I i II) alternatywnych pozycji G2 są, zatem wartościami skrajnymi (odpowiednio maksimum i minimum) wśród wszystkich prezentowanych tu kompleksów  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-poliamina}^{n+}\text{-metal}^{m+}$ .

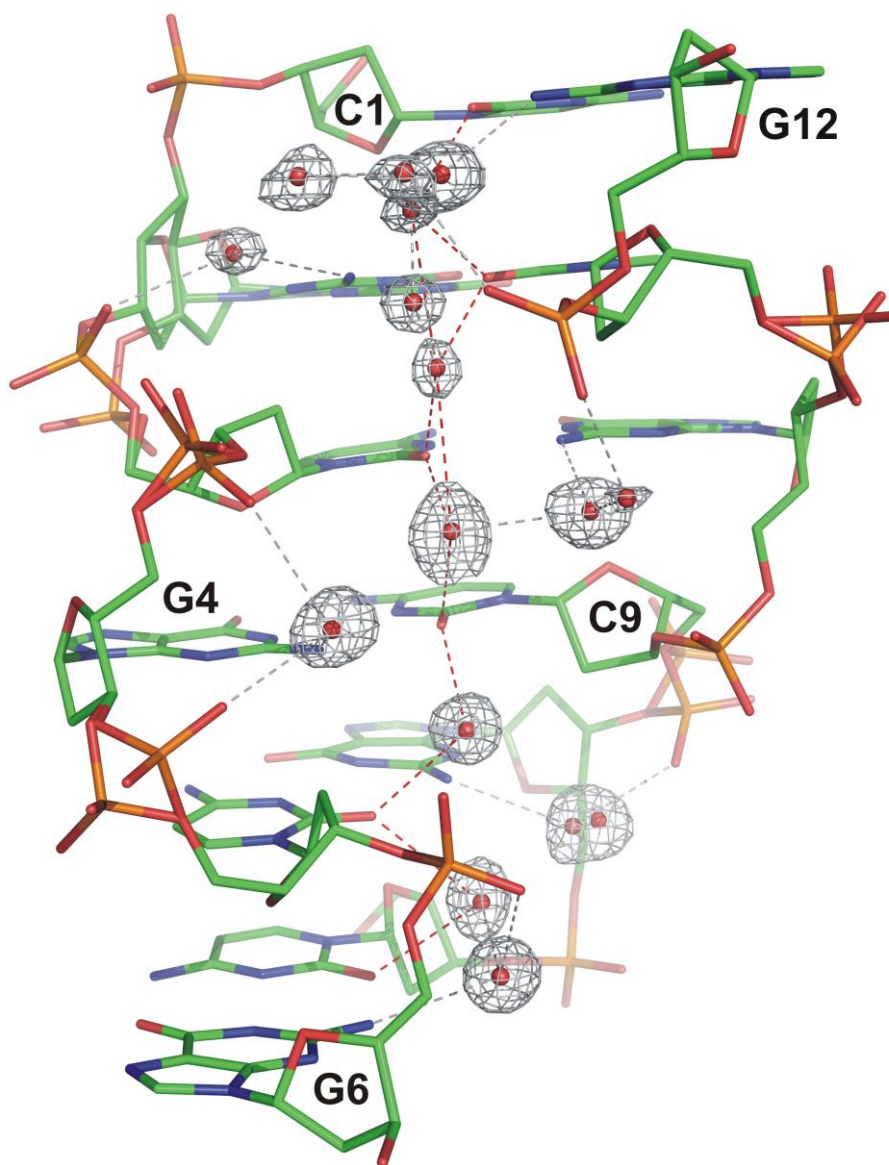


**Rys. 47.** Różnice w oddziaływaniach warstwowych dla konformacji G2(I) (zielony) i G2(II) (pomarańczowy) w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ .

### V.3.4 Hydratacja

Tak jak w pozostałych omawianych w tej pracy strukturach Z-DNA–poliamina<sup>n+</sup>–metal<sup>m+</sup>, również kompleks  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  wykazuje podobieństwo do innych wysokorozdzielczych struktur Z-DNA pod względem architektury sfery hydratacyjnej, zawierającej rozwiniętą sieć wiązań wodorowych stabilizujących upakowanie cząsteczek w kryształach. Część asymetryczna komórki elementarnej zawiera 59 cząsteczek wody. Cechy geometrii hydratacyjnej dla kryształów Z-DNA takie jak spin hydratacji, pozycje cząsteczek wody pomiędzy grupami N2\_G i atomami tlenu grup fosforanowych oraz brak cząsteczek wody

oddziałujących z atomami N3\_G, również charakteryzują kompleks  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  (Rys. 48). W układach takich zwykle dwie cząsteczki wody tworzą także wiązania wodorowe z O6\_G.



**Rys. 48.** Hydratacja DNA w kompleksie  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ . Przerywane czerwone linie oznaczają wiązania wodorowe, które charakteryzują tzw. spin hydratacji w małej bruździe dupleksów Z-DNA.

Pary zasad G2(I)·C11 i G2(II)·C11 mają odmienny obraz hydratacji. Atom N2\_G2(I) tworzy wiązania wodorowe z Wodą10 (2,82 Å), która to z kolei oddziałuje z OP\_C3 (2,82 Å). Atom O6\_G2(I) oddziałuje poprzez wiązanie wodorowe z Wodą11 (3,26 Å). Dla konformacji G2(II) brak wiązania N2···Woda10, obecne jest natomiast silniejsze O6···Woda11 (3,11 Å) oraz dodatkowe O6···Woda34 (2,68 Å). Woda34 tworzy wiązania wodorowe z cząsteczkami wody 59 (2,35 Å) i 60 (2,92 Å) ze sfery koordynacyjnej kationu  $\text{Cr}^{3+}(1)$ .

### V.3.5 Dyskusja wyników dla kompleksu $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$

Kation  $\text{Cr}^{3+}$ , w przeciwieństwie do  $\text{Cr}^{6+}$ , może koordynować z makromolekułami w komórkach żywych (DNA, RNA, białka, lipidy) (Anderson, 2000; Jacewicz *i in.*, 2012). W literaturze brak szerszych informacji strukturalnych o oddziaływaniach kwas nukleinowy- $\text{Cr}^{3+}$  w układach biologicznych. W szczególności nie zdeponowano jak dotąd struktur kompleksów Z-DNA- $\text{Cr}^{3+}$  w bazie PDB. Skąpe dane literaturowe dotyczące próby odpowiedzi o naturę interakcji DNA- $\text{Cr}^{3+}$  (szczególnie formy Z) wskazywały na grupy fosforanowe i/lub atom N7 guaniny jako miejsca wiązania się kompleksów  $\text{Cr}^{3+}$  z DNA (Beyersmann & Koster, 1987; Zhitkovish *i in.*, 1996; Watson *i in.*, 1999; Arakawa *i in.*, 2000). Badania te, nie oparte na danych krystalograficznych, poza ogólnym charakterem oddziaływań, nie opisywały jednak sposobu koordynacji kompleksów  $\text{Cr}^{3+}$  z DNA.

Prezentowane w nieniejszej pracy wyniki badań nad strukturą kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  wykazują, że jon  $\text{Cr}^{3+}$  nie tworzy bezpośredniego wiązania koordynacyjnego z atomami O6 lub N7 guaniny czy też tlenu grup fosforanowych Z-DNA. Zaobserwowano tylko pośrednie oddziaływanie między kwasem nukleinowym, a kationem metalu poprzez cząsteczki wody tworzące wiązania wodorowe z atomami tlenu grup fosforanowych oraz zlokalizowanych w dużej bruzdzie dupleksu  $d(\text{CGCGCG})_2$ , atomami N7 i O6 guaniny. Można zasugerować, że inertność akwakompleksów  $\text{Cr}^{3+}$  w reakcjach podstawienia jest jedną z przyczyn braku bezpośrednich oddziaływań  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Ciekawym zatem zagadnieniem w aspekcie chemii koordynacyjnej jest pytanie o możliwość bezpośredniego wiązania pomiędzy Z-DNA- $\text{Cr}^{3+}$ , na które to odpowiedź mogłyby dać kolejne badania strukturalne z wykorzystaniem innego kompleksu  $\text{Cr}^{3+}$  o większej labilności.

Obliczone parametry heliakalne dla cząsteczki DNA w kompleksie z  $\text{Cr}^{3+}$  jednoznacznie przypisują jej formę Z. Spośród prezentowanych w tej pracy kompleksów Z-DNA, struktura z jonami  $\text{Cr}^{3+}$  wykazuje największą elastyczność tj. podatność szkieletu cukrowo-fosforanowego na występowanie podwójnych konformacji. Stopień nieuporządkowania nici DNA dla kompleksu  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  jest większy niż dla  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ . Poza alternatywnymi pozycjami grup fosforanowych, mapa gęstości elektronowej wyraźnie pokazuje także podwójną konformację pierścienia zasady w nukleotydzie G2 w kompleksie z  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Stopień uporządkowania dupleksów Z-DNA (Tabela 8; Ho & Mooers, 1997) w porównaniu z kompleksem  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  jest znacząco wyższy, o czym decyduje stabilna pozycja zasad aromatycznych (pojedyncza konformacja). Różnica pomiędzy konformacjami G2(I) i G2(II) w omawianej tutaj strukturze  $d(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$  spowodowała zmianę w typowym schemacie oddziaływań warstwowych i wiązań wodorowych



obserwowanym dla helis Z-DNA dla pary nukleotydów G2C3–G10C11. Analiza położenia pierścieni zasad w nukleotydach G2(I) i G2(II) wskazuje na tendencję nici DNA do utrzymania jak najkorzystniejszych kontaktów z cząsteczkami wody. Podwójne konformacje G2 umożliwiają zarówno oddziaływania N2\_G2(I)···Woda10···OP\_C3, jak i O6\_G2(II)···Woda34···Woda59–Cr<sup>3+</sup>(1). Alternatywne pozycje nukleotydu G2 nie mają wpływu na położenie komplementarnej zasady C11. Ewentualne zmiany położenia C11, które miałyby być skorelowane z pozycjami G2(I) i G2(II), w celu zachowania kanonicznego parowania Watsona–Cricka dla obu pozycji G2, prawdopodobnie naruszyłyby układ wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i atomami O2\_C – tzw. spin hydratacji. Brak śladów alternatywnych pozycji pierścienia zasady dla nukleotydu C11 na mapie gęstości elektronowej potwierdza po raz kolejny zasadniczą rolę, jaką odgrywa spin hydratacji w stabilizacji DNA.

Z punktu widzenia tego samego typu (B) upakowania helis Z-DNA w sieci krystalicznej jak i obecności kompleksu metalu przejściowego, jedynymi jak dotąd dostępnymi w PDB strukturami są kompleksy jonu kobaltu d(CACG<sup>I</sup>UG)<sub>2</sub>–[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> (1omk; Schuerman *i in.*, 2003) i d(TGCGCA)<sub>2</sub>–[Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>]<sup>3+</sup> (362d; Harper *i in.*, 1998).

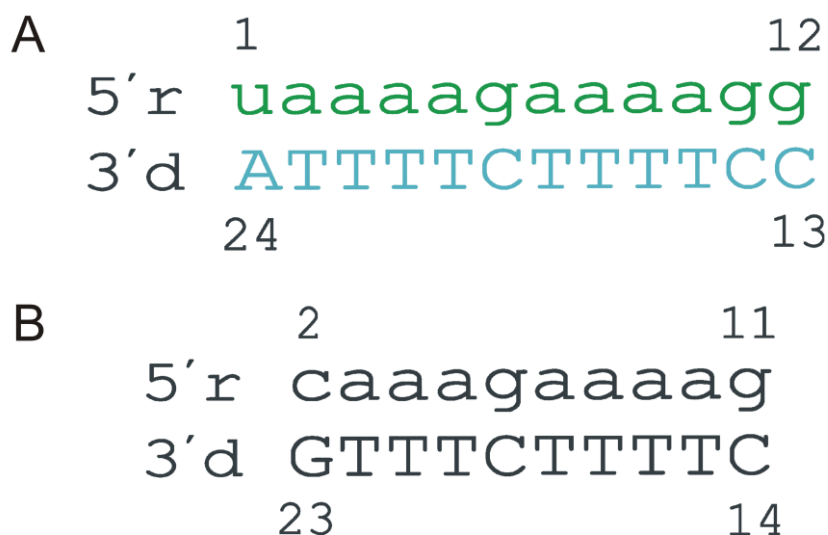
Cząsteczka sperminy<sup>4+</sup> mimo jej obecności w układzie krystalizacyjnym, nie została zidentyfikowana na mapie gęstości elektronowej struktury d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Cr<sup>3+</sup>. Sugeruje to nieuporządkowanie całej cząsteczki poliaminy<sup>4+</sup> i brak określonego, specyficznego schematu oddziaływań wodorowych w kompleksie z jonami Cr<sup>3+</sup>. Tendencja taka została już opisana dla sperminy<sup>4+</sup> w omówionym poprzednio kompleksie d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>.

Na podstawie anomalnej mapy różnicowej i mapy  *Fo–Fc*  stwierdzono, że w rozwiązanym modelu jony Cr<sup>3+</sup>(1) i Cr<sup>3+</sup>(2) stanowią dwa niezależne indywidua, zatem nie należy ich traktować jako jednego kationu w dwóch alternatywnych pozycjach.

## V.4 Wyniki badań nad kompleksem RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>

### V.4.1 Ogólna struktura i parametry helikalne

Sekwencja nici RNA analizowanej hybrydy RNA:DNA składa się z 5' urydyny z tzw. fragmentu U (Ilyinskii & Desrosiers, 1998) i następujących po niej jedenastu nukleotydów sekwencji PPT wirusa HIV-1 (Rys. 49). W prezentowanej strukturze RNA:DNA większość parametrów helikalnych jest typowa dla formy A helisy kwasów nukleinowych (Tabela 33).



**Rys. 49.** (A) Sekwencja hybrydy RNA:DNA analizowanej w tej pracy. Łańcuch RNA pokazany jest na zielono, małymi literami, a nić DNA oznaczona jest dużymi literami na turkusowo. (B) Sekwencja hybrydy analizowanej przez Kopkę *i in.*, (2003) z numeracją zaadaptowaną z A.

Zasady u1(*anti*) i A24(*syn*) oddziałują tylko poprzez jedno wiązanie wodorowe (2,57 Å) pomiędzy atomem N6 adeniny i karbonylowym atomem tlenu O4 urydyny (Rys. 50). To niekanoniczne oddziaływanie zasad zmienia typowe średnie wartości kilku parametrów helikalnych. Największy wpływ pary u1(*anti*)·A24(*syn*) widoczny jest dla kąta skrętu helikalnego (ang. *helical twist*), kąta skrętu (ang. *twist*) i parametru *inclination*. Z pominięciem nukleotydów u1(*anti*)·A24(*syn*), hybryda ma 10,67 zasad na jeden obrót helisy, natomiast średni kąt skrętu helisy wynosi 33,73°. Te wartości parametrów helikalnych są typowe dla A-DNA i A-RNA. Wartość 15,70° to wielkość zbliżona do średniej parametru *inclination* dla dupleksów mających formę A. Biorąc pod uwagę całą helisę hybrydy [łącznie z parą u1(*anti*)·A24(*syn*)] mającą 12,65 zasad na jeden obrót, stwierdzić można, że cząsteczka ta jest podobna do A'-RNA. Z kolei parametr *inclination* (7,48°) znajduje się poza przedziałem zwykle przyporządkowywanym dupleksom mającym typ A. Parametry helikalne i te dotyczące szkieletu

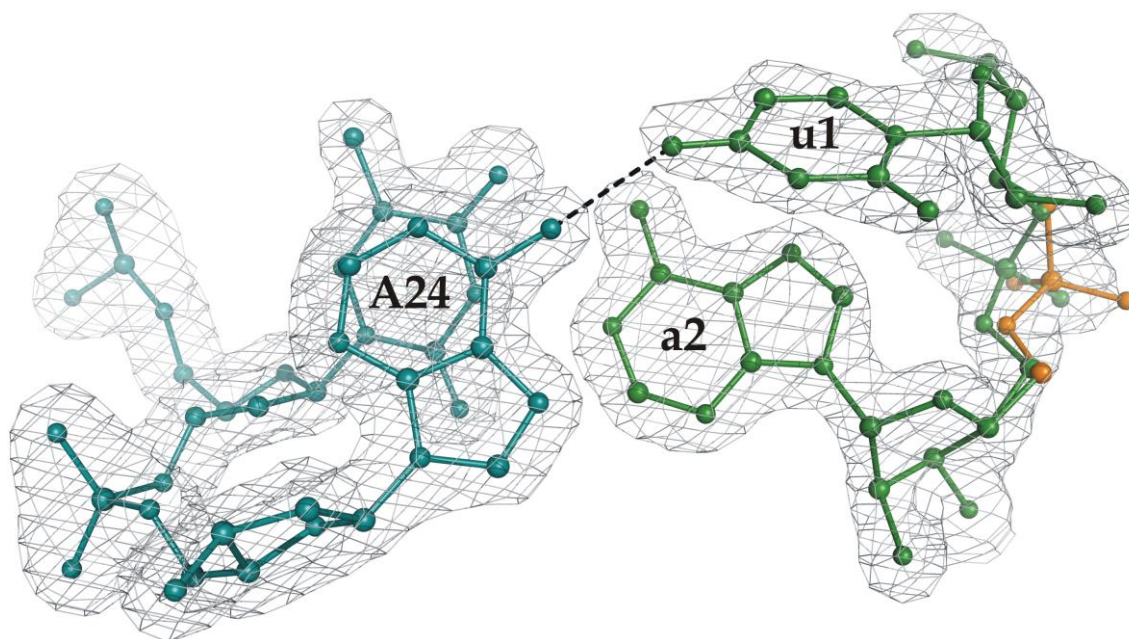
cukrowo–fosforanowego zakwalifikować można jako bliskie formy AI (Schneider *i in.*, 2004; Svozil *i in.*, 2008).

**Tabela 33.** Średnie wartości wybranych parametrów helikalnych dla dupleksów typu A kwasów nukleinowych, wzięte z prac Lu & Olson (2003) i Arnott (1999).

	Helical twist $\Omega_h$ (°)	Helical rise h (Å)	Inclination $\eta$ (°)	Shift (Å)	Slide (Å)	Rise (Å)	Tilt (°)	Roll (°)	Twist (°)
A-DNA	32,70	2,55	19,80 <sup>(a)</sup>	0,00	-1,40	3,30	0,0	12,4	30,3
A-RNA	32,70	2,81	15,50	-0,08	-1,48	3,30	-0,4	8,6	31,6
A' -RNA	30,00	3,00	10,60	0,05	-1,88	3,39	-0,1	5,4	29,5
RNA:DNA bez pary u1·A24 <b>Ta praca</b>	33,73	2,82	15,70	0,11	-1,14	3,27	0,19	8,83	32,22
RNA:DNA Kod PDB 1pjo <sup>(b)</sup>	32,64	2,89	13,97	0,00	-1,26	3,23	-1,19	7,91	31,23

<sup>(a)</sup> W dupleksach typu A, parametr  $\eta$  ma zwykle wartości pomiędzy 10 a 20° (Kennard & Hunter, 1991), ale może być także równy 7° (Heinemann *i in.*, 1987)

<sup>(b)</sup> Opisana przez Kopkę *i in.* (2003).

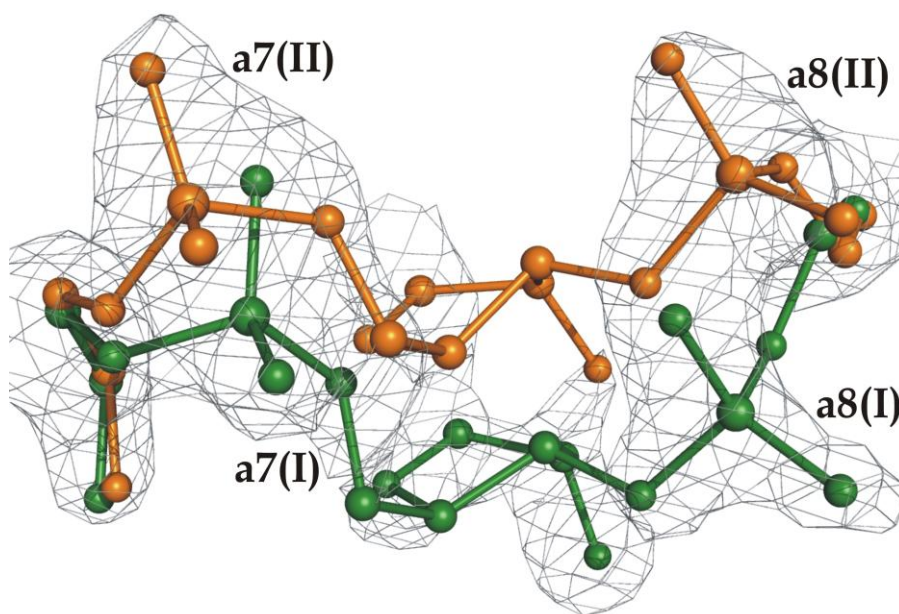


**Rys. 50.** Zasady u1(*anti*) i A24(*syn*) połączone jednym wiązaniem wodorowym (2,57 Å). Nukleotyd A24 ma kąt glikozydowy w konformacji *syn* ( $\chi = 64,7^\circ$ ). Mapa gęstości elektronowej  $2Fo - Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Po analizie kątów torsyjnych szkieletu cukrowo–fosforanowego hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> stwierdzono, że inaczej niż wszystkie pozostałe, nukleotydy a2 i T23 mają formę pośrednią A/B. Pojedynczy, dobrze zdefiniowany na mapie gęstości elektronowej łańcuch DNA w badanym kompleksie RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>, ma pierścienie cukrowe w konformacji C3'-*endo*, z wyjątkiem pierścieni z końca 3', które mają formy C2'-*endo* dla T22 ( $P = 154,4^\circ$ ) i O4'-*endo* dla T23 ( $P = 84,6^\circ$ ) oraz A24 ( $P = 72,8^\circ$ ).

#### V.4.2 Nieuporządkowania w łańcuchu RNA

Szkielet cukrowo–fosforanowy łańcucha RNA wykazuje lokalne nieuporządkowanie (to jest istnienie podwójnych konformacji). Mapa gęstości elektronowej ujawniła dwa fragmenty nici RNA istniejące w alternatywnych konformacjach (I i II): nukleotydy u1–a2 (I<sub>1-2</sub> i II<sub>1-2</sub>) oraz nukleotydy g6–a8 (I<sub>6-8</sub> i II<sub>6-8</sub>). Jakość mapy gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$  w nieuporządkowanych rejonach jest generalnie dobra za wyjątkiem małego fragmentu pierścienia rybozy nukleotydu a7 w konformacji II, dla którego istnieje przerwa przy konturze  $1\sigma$  (Rys. 51).

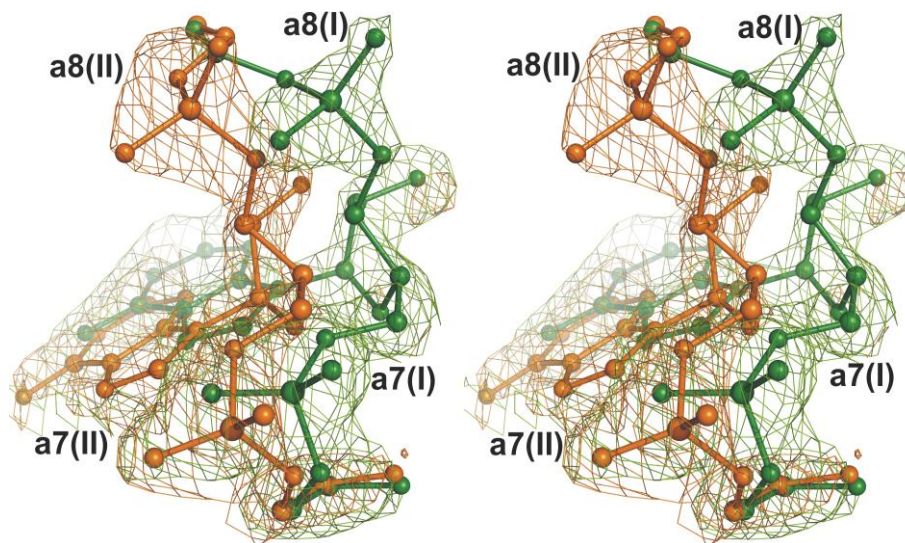


**Rys. 51.** Mapa  $2Fo-Fc$  (kontur  $1\sigma$ ) fragmentu dupleksu hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> pomiędzy zasadami g6–a8 RNA mającymi podwójne konformacje (I<sub>6-8</sub>, zielony; II<sub>6-8</sub>, pomarańczowy).

Jednakże szkielet cukrowo–fosforanowy w tym rejonie (g6–a8) na mapach OMIT może być uznany za wiarygodny, szczególnie, że sąsiadujące grupy fosforanowe, które służą jako strukturalne miejsca kotwiczące, mają dobrze zdefiniowaną gęstość elektronową (mapy  $2Fo-Fc$  i  $Fo-Fc$ , Rys. 51 i 52). Ponadto eliminacja konformacji II<sub>6-8</sub> z udokładnianego modelu prowadziła do wzrostu  $R$  i  $R_{\text{free}}$  odpowiednio o 1,3% i 1,4%. Nieuporządkowane fragmenty



szkieletu cukrowo–fosforanowego są zakotwiczone do wspólnych zasad, za wyjątkiem zasady a7, która została wymodelowana w dwóch pozycjach (I i II). Te dwie konformacje wzdłuż łańcucha RNA wykazują różnice co do wartości kątów torsyjnych i pseudorotacji.



**Rys. 52.** Rysunek stereograficzny przedstawiający mapę OMIT  $F_o - F_c$  (kontur  $2,5\sigma$ ) fragmentu hybrydy RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> pomiędzy nukleotydami g6–a8 RNA, mającymi podwójne konformacje (I<sub>6-8</sub>, zielony; II<sub>6-8</sub>, pomarańczowy).

Terminalne pary zasad (szczególnie inne niż kanoniczna para cytozyna·guanina) mogą być nieuporządkowane z powodu ich niższej stabilności i braku oddziaływań warstwowych, a w konsekwencji mogą być gorzej zdefiniowane na mapach gęstości elektronowej (Xiong & Sundaralingam, 1998). Dla omawianej hybrydy RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup>, zasady u1(*anti*) i A24(*syn*) na końcu 5' nici RNA tworzą między sobą tylko jedno, niekanoniczne wiązanie wodorowe, a nukleotyd A24 ma nietypową konformację *syn* ( $\chi = 64,7^\circ$ ; Rys. 50). Analiza geometrii zasad u1(*anti*) i A24(*syn*) sugeruje, że ich wzajemne ułożenie było prawdopodobnie ułatwione przez niską barierę energetyczną przejścia A24(*anti*)→A24(*syn*) ( $1,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; Neidle, 2008), bardziej korzystne oddziaływania warstwowe z A23 i możliwość utworzenia dodatkowego wiązania wodorowego (ang. *bifurcated*) z zasadą a2 (N6\_A24...N1\_a2; długość wiązania  $3,35 \text{ \AA}$ ). Zaobserwowano duże różnice w wartościach kątów  $\varepsilon$  i  $\zeta$  łańcucha cukrowo–fosforanowego dla nukleotydu u1 w konformacjach I<sub>1-2</sub> i II<sub>1-2</sub>. Kąty te wynoszą  $\varepsilon = 223,1^\circ$ ,  $\zeta = 297,7^\circ$  i  $\varepsilon = 185,0^\circ$   $\zeta = 346,8^\circ$  dla konformacji I<sub>1-2</sub> i II<sub>1-2</sub>. Dla podwójnych konformacji u1 różnice widoczne są także dla wartości kątów  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\gamma$  i wynoszą one odpowiednio  $293,6^\circ$ ,  $189,1^\circ$ , i  $43,3^\circ$  oraz  $250,1^\circ$ ,  $197,0^\circ$  i  $45,6^\circ$  dla konformacji I<sub>1-2</sub> i II<sub>1-2</sub>. Nie ulega wątpliwości, że wpływ na wymienione różnice ma wartość kąta  $\zeta$  z nukleotydu u1, szczególnie w przypadku konformeru II<sub>1-2</sub>.

Inny rejon łańcucha RNA mający zwiększone nieuporządkowanie (labilność konformacyjną) zawiera nukleotydy g6–a8. Pierścienie rybozy a7 i a8 mają formę C2'-*exo* w konformacji I<sub>6-8</sub> (odpowiednio  $P = 359,9^\circ$  i  $355,6^\circ$ ) natomiast dla konformacji II<sub>6-8</sub> jest to C3'-*endo* (odpowiednio  $P = 9,7^\circ$  i  $7,6^\circ$ ). Nieuporządkowaniu nici RNA dla konformacji I<sub>6-8</sub> towarzyszy także skorelowana zmiana kątów torsyjnych  $\alpha$  i  $\gamma$  nukleotydu a8 z typowej konformacji *gauche*<sup>-</sup>/*gauche*<sup>+</sup> do nietypowej *trans/trans* (tzw. ang.  *$\alpha/\gamma$  flipping*; oznacza to, że wiązanie O5'–C5' jest „przekręcone”, a szkielet fosforanowo-cukrowy „wyprostowany”; Conn *i in.*, 1999). Wzrost podatności na zmiany konformacyjne (deformacje) dla fragmentu sekwencji a-g-a w hybrydach RNA:DNA był już wcześniej zaznaczany w literaturze, dla przykładu przez Kopkę *i in.* (2003). W pracy tych autorów stwierdzono, że dla uporządkowanego regionu a5-g6-a7 łańcucha RNA brak jest oddziaływań warstwowych zasady a5 z g6. Jednak w obecnie opisywanej strukturze dodekameru RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> sytuacja jest zupełnie odmienna. Nieuporządkowanie zaznaczone jest głównie w podwójnych konformacjach nici RNA i ma ograniczony wpływ na oddziaływania warstwowe w rejonie nukleotydów a5-g6-a7.

Większość wartości (1,92–2,67 Å) parametru Z<sub>p</sub> (opisującego przesunięcia atomów fosforu sąsiednich par zasad od płaszczyzny xy lokalnego układu odniesienia wyznaczonego dla tych par) wskazuje na formę A helisy omawianej hybrydy. Dla konformacji I<sub>(1-2, 6-8)</sub> nici RNA, dwunukleotydowe fragmenty (ang. *steps*) 1–3 (u1a2/T23A24–a3a4/T22T21) i 7 (a7a8/T18T17) mają odpowiednio wartości Z<sub>p</sub>: 1,02, 0,76, 1,35, i 1,49 Å. Mieszczą się one pomiędzy przedziałami wartości tego parametru charakterystycznymi dla A-DNA (Z<sub>p</sub> > 1,50 Å) i B-DNA (Z<sub>p</sub> < 0,5 Å) (Lu & Olson, 2003). Dla konformacji RNA oznaczonej jako II<sub>(1-2, 6-8)</sub> wartości Z<sub>p</sub> dla dwunukleotydowego fragmentu 1–3, są także zawarte w przedziale pomiędzy A-DNA i B-DNA i wynoszą odpowiednio: 0,81, 0,76 i 1,36 Å. Jednakże, dla dwunukleotydowego fragmentu 7 (a7a8/T18T17), wartość 2,02 parametru Z<sub>p</sub> wskazuje na formę A.

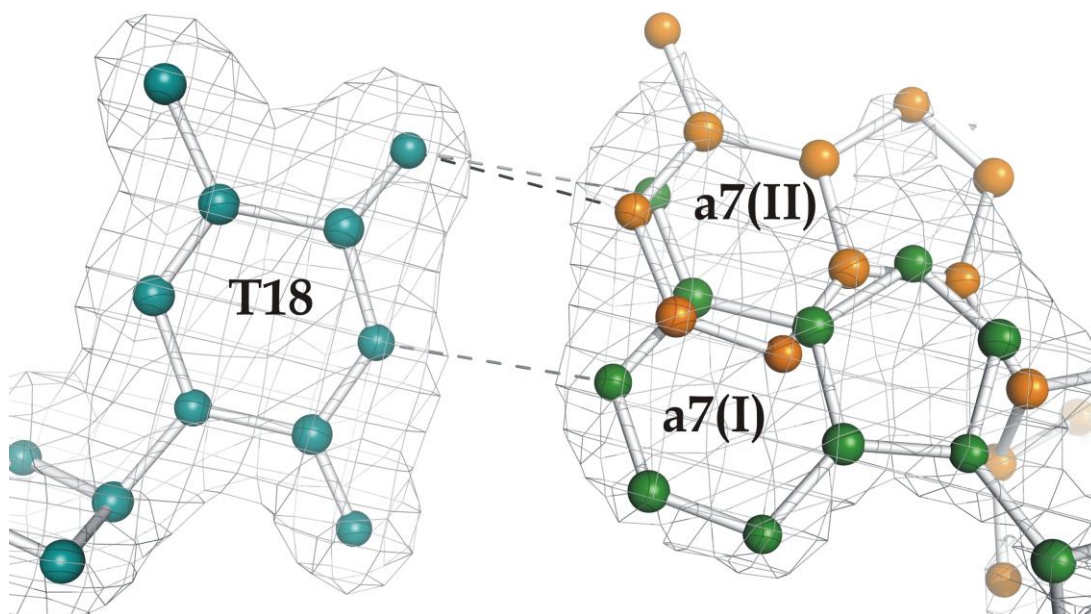
Analiza trajektorii osi helisy RNA:DNA w kompleksie z RT/HIV-1 wykazuje, że oś hybrydy ma silne zgięcie w regionie niesparowanych zasad, z całkowitym kątem zagięcia osi (ang. *axis bend*) ~40° (Sarafianos *i in.*, 2001). Z drugiej strony, oś helisy omawianej hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>, ma tylko niewielkie zagięcie całkowite ~10,7° (maksimum ~4,4°, dla pary zasad a2·T23), co jest wartością mniejszą niż dla podobnej hybrydy RNA:DNA opisywanej przez Kopkę *i in.*, (2003) (całkowite = 24,6°, maksimum = 4,0° dla pary a7·T18) nie mającej żadnych podwójnych konformacji dla środkowego fragmentu helisy (a5-g6-a7) (Tabela 34).

Szerokość małej bruzdy (obliczona wg Stofer & Lavery, 1994; El Hassan & Calladine, 1998; tj. po odjęciu 5,8 Å od promienia dwóch grup fosforanowych) wykazuje niewielkie

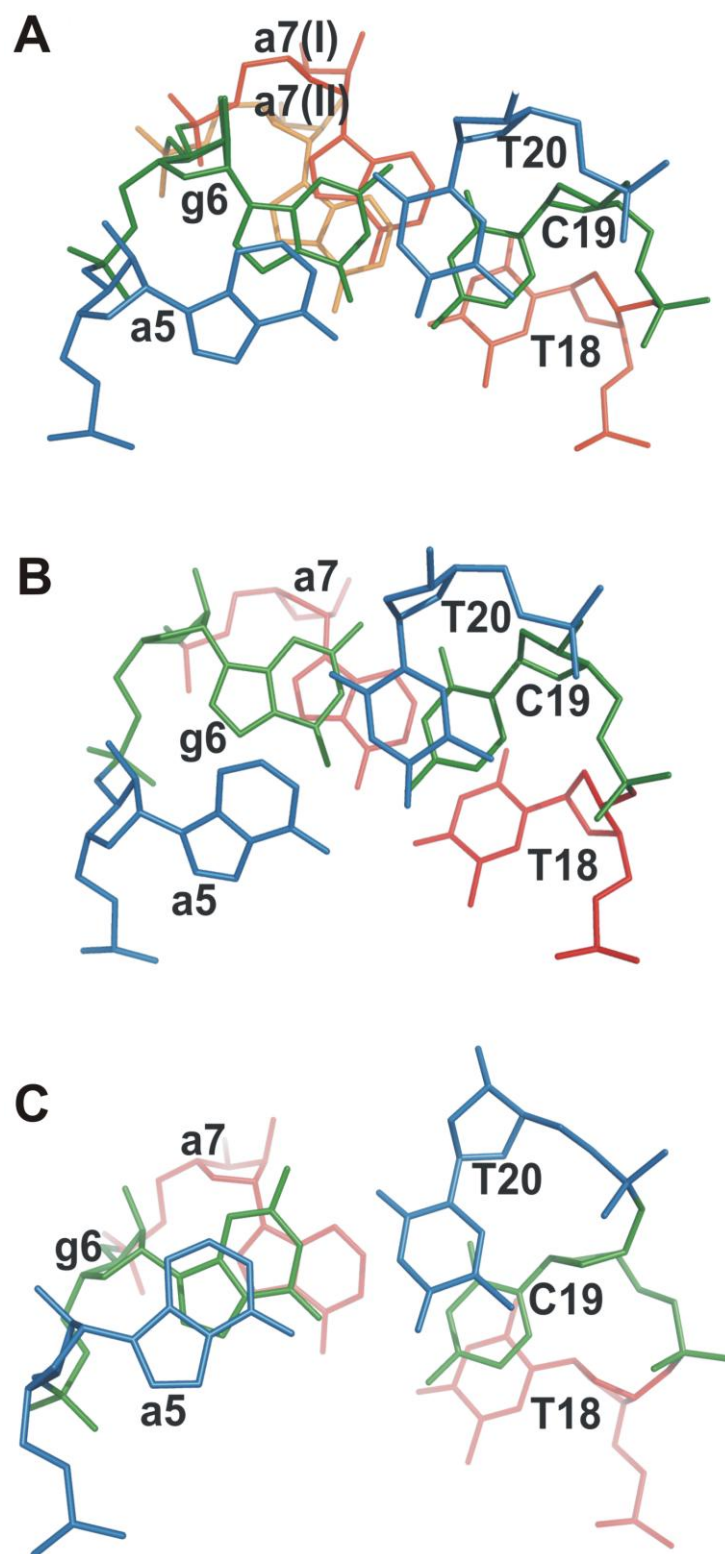
różnice dla konformacji  $I_{(1-2, 6-8)}$  (9,2–10,5 Å) i  $II_{(1-2, 6-8)}$  (9,4–10,7 Å) łańcucha RNA. Szerokość dużej bruzdy wynosi 5,0–6,4 Å dla konformacji  $I_{(1-2, 6-8)}$  i 5,5–6,2 Å dla konformacji  $II_{(1-2, 6-8)}$ .

### V.4.3 Oddziaływania warstwowe

Dla większości par typu Watsona–Cricka w opisywanej hybrydzie RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> pierścienie kolejnych par zasad w znacznym stopniu znajdują się nad sobą, a powierzchnia pokrycia waha się od 2,87 do 4,49 Å<sup>2</sup> dla nici RNA i od 2,63 do 5,29 Å<sup>2</sup> dla łańcucha DNA. Stopień nakładania się jest mniejszy dla fragmentu agaa/TTCT, który zawiera adeninę 7 wymodelowaną w dwóch konformacjach. Adenina 7(I) tworzy kanoniczną parę typu Watsona–Cricka z tyminą 18. Z powodu podwójnej konformacji nici RNA adenina 7(II) jest przesunięta w płaszczyźnie pary zasad, co z jednej strony skutkuje wzrostem powierzchni pokrycia dla fragmentu ga/TC (6,58 Å<sup>2</sup>), oraz prowadzi do ograniczenia liczby wiązań wodorowych do jednego [2,72 Å, a7(II)\_N1...O4\_T18)] (Rys. 53). Redukcja powierzchni pokrycia jest widoczna dla następujących fragmentów łańcucha RNA: 5 (ag/CT, 1,86 Å<sup>2</sup>), 6 (ga/TC dla a7(I), 1,75 Å<sup>2</sup>) i dla 7 (aa/TT dla a7(II), 0,57 Å<sup>2</sup>) (Rys. 54). Nakładanie warstwowe zredukowane jest do powierzchni ~1,5 Å<sup>2</sup> dla zasad DNA fragmentu 7 (aa/TT). Pierścień zasady u1 nie jest zaangażowany w oddziaływania warstwowe z a2. Parametry *propeller*, *roll* i *buckle* mogą być użyte do charakterystyki stopnia oddziaływań warstwowych, jak to zilustrowano w Tabeli 34.



**Rys. 53.** Parowanie zasad dla nukleotydów a7(I)·T18 i a7(II)·T18. (I, zielony; II, pomarańczowy). Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .



**Rys. 54.** Oddziaływania warstwowe pomiędzy zasadami nukleotydów aga/TCT w (A) strukturze RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup> opisywanej w tej pracy, (B) dekamerze RNA:DNA opisanym przez Kopkę *i in.*, (2003), (C) hybrydy RNA:DNA w kompleksie z RT/HIV-1 (kod PDB: 1hys; Sarafianos *i in.*, 2001). Niebieski, a5·T20; zielony, g6·C19; czerwony (konformacja I)/pomarańczowy (konformacja II) a7·T18.



**Tabela 34.** Parametry helikalne (°) dotyczące oddziaływań warstwowych dla prezentowanej strukturze RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> (górne wartości) i dla odpowiadającym im nukleotydów w modelu PDB 1pjo (Kopka *i in.*, 2003) (dolne wartości). Wartości w nawiasach dotyczą II konformacji łańcucha RNA w niniejszej strukturze RNA:DNA.

forma A DNA <sup>(a)</sup>	forma B DNA <sup>(a)</sup>	Zasada	u1	a2	a3	a4	a5	g6	a7	a8	a9	a10	g11	g12	Średnia bez pary u1-A24	Całkowite zagięcie osi helisy
-0,1	0,5	Buckle	-6,15 -	-0,67 -27,19	-2,95 1,40	0,72 6,45	-6,61 2,83	-6,23 -18,82	-12,27(-1,93) -16,76	-10,27 -3,99	-6,41 -0,34	-4,15 -7,42	-2,16 5,84	0,78 -	-4,57 -5,80	
-11,8	-11,4	Propeller	-42,85 -	-18,86 -10,66	-12,65 -6,55	-24,63 -20,80	-19,29 -22,89	-11,65 -2,12	-21,97(-20,25) -5,07	-16,38 -6,62	-16,60 -14,35	-15,36 -4,17	-9,13 -7,60	-5,65 -	-15,65 -10,08	
8,0	0,6	Roll	23,37 -	1,93 8,89	12,07 2,27	9,42 6,33	8,19 20,01	8,23 10,32	18,52(18,81) 7,51	9,68 6,17	6,92 6,22	7,90 3,43	5,46 -	- -	8,83 7,91	
		Zagięcie osi helisy	- -	4,5(4,3) -	3,3 3,2	2,4 3,1	2,2 3,1	2,4(2,6) 3,4	1,4(1,4) 4,0	2,0(1,9) 3,4	1,6 2,9	1,6 2,2	1,3 1,6	1,0 -	- -	10,6(10,9) 24,6

<sup>(a)</sup> Wartości dla wysokorozdzielczych struktur A i B-DNA zostały wzięte z pracy Olson *i in.* (2001)

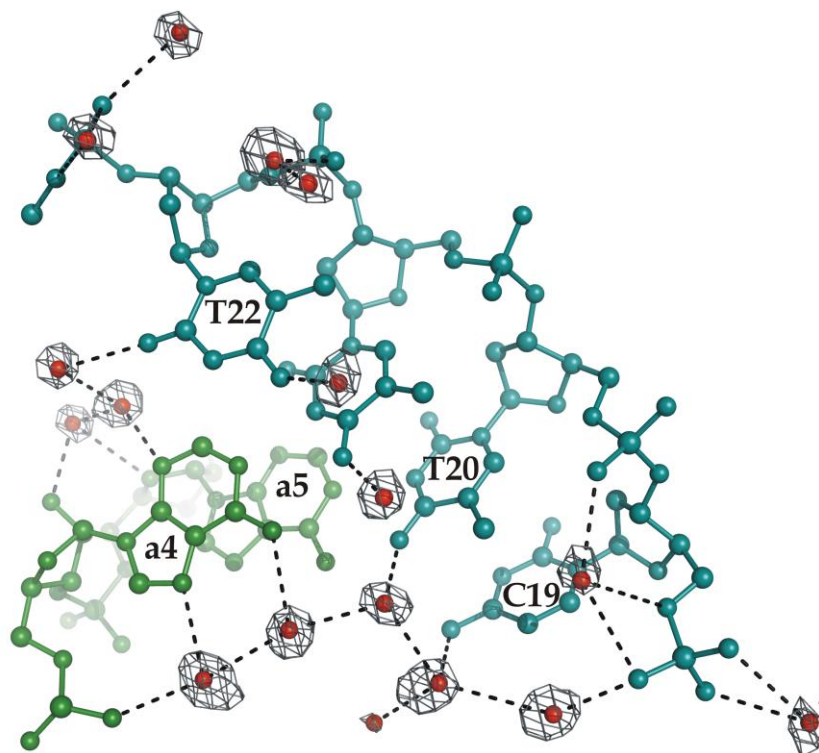
#### V.4.4 Hydratacja i wiązanie kationów Mg<sup>2+</sup>

W części asymetrycznej komórki elementarnej na sferę hydratacyjną duplexu RNA:DNA składa się 76 cząsteczek wody. Stwierdzono, że z wyjątkiem czterech cząsteczek wody tworzących bliskie kontakty z symetrycznie równoważnymi lub mającymi podwójne konformacje fragmentami RNA:DNA, obsadzenie wszystkich pozostałych wynosi 1,0. W badanej hybrydzie nieć RNA jest w większym stopniu hydratowana niż DNA. W całym systemie wiązań wodorowych duplexu RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> 25 cząsteczek wody oddziałuje z grupami fosforanowymi, zaś 17 tworzy wiązania wodorowe z atomami O2', O3', O4' i O5'. Z kolei zasady azotowe są hydratowane przez 27 cząsteczek H<sub>2</sub>O, a 11 zostało znalezionych w sferach koordynacyjnych jonów Mg<sup>2+</sup>. Zasady purynowe tworzą wiązania wodorowe z cząsteczkami wody w liczbie od jeden do trzy. Trzy cząsteczki wody poza formowaniem wiązań wodorowych z zasadami, oddziałują także z grupami fosforanowymi nukleotydów a4, a10 i g12. Zasady pirymidynowe tworzą także od jednego do trzech wiązań wodorowych z cząsteczkami H<sub>2</sub>O, które z kolei mogą być zaangażowane w oddziaływania z dwoma sąsiadującymi ze sobą pierścieniami zasad pirymidynowych w łańcuchu DNA. Cząsteczki wody mostkują atomy O2' z O3' lub O4'. Sąsiednie grupy fosforanowe w tej samej nici są także mostkowane przez cząsteczki

wody. Wymienione schematy hydratacji są typowe dla dupleksów kwasów nukleinowych w formie A (Rys. 55; Schneider *i in.*, 1992; Egli *i in.*, 1996). Szczegółowe informacje dotyczące hydratacji hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> zawarte są w Tabeli 35.

**Tabela 35.** Oddziaływania cząsteczek wody z atomami hybrydy RNA:DNA i Mg<sup>2+</sup>.

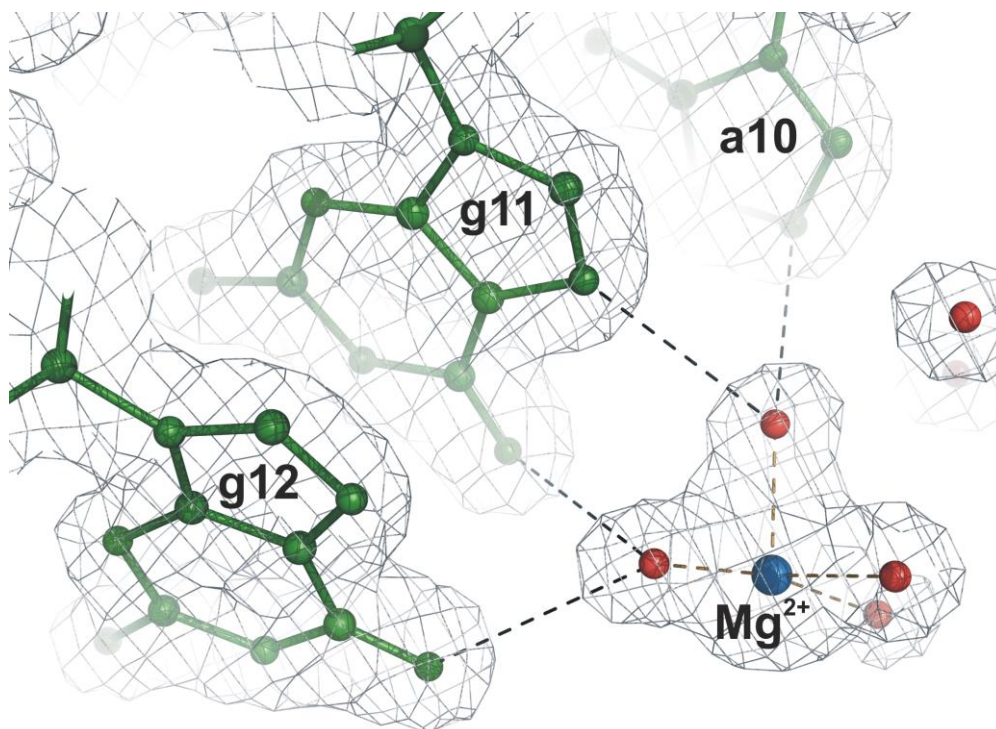
Woda – RNA	Długość (Å)	Woda – DNA	Długość (Å)	Woda – Mg <sup>2+</sup>	Długość(Å)
W18 – N3 (a3)	2,78	W2 – O2P (T22)	2,61	W44 – Mg <sup>2+</sup> (1)	1,86
W1 – O2' (a3)	2,75	W4 – O2P (T18)	2,95	W45 – Mg <sup>2+</sup> (1)	2,03
W21 – N3 (a2)	2,82	W4 – O5' (T18)	3,25	W46 – Mg <sup>2+</sup> (1)	1,73
W22 – O1P (g12)	2,71	W4 – O2P (C19)	2,74	W57 – Mg <sup>2+</sup> (1)	1,85
W23 – O2P (g12)	2,63	W5 – N4 (C14)	2,91		
W24 – N3 (a9)	2,79	W24 – O2 (T17)	3,43	W42 – Mg <sup>2+</sup> (2)	2,00
W25– O2' (a8 I)	2,82	W10 – O4 (T23)	2,71	W43 – Mg <sup>2+</sup> (2)	2,05
W32 – O2' (a8 I)	2,61	W11 – N3 (A24)	2,85	W56 – Mg <sup>2+</sup> (2)	1,83
W25 – O3' (a8 I)	3,42	W27 – O4 (T15)	2,68	W59 – Mg <sup>2+</sup> (2)	1,99
W26 – N7 (g12)	2,85	W28 – O1P (T22)	2,92	W69 – Mg <sup>2+</sup> (2)	1,99
W26 – O2P (g12)	2,78	W29 – O2P (T23)	3,03		
W32 – O4' (a9)	3,14	W29 – O5' (T23)	3,34	W63 – Mg <sup>2+</sup> (3)	1,98
W33 – O2' (a5)	2,58	W30 – O2P (T23)	3,04	W64 – Mg <sup>2+</sup> (3)	1,94
W33 – O4' (g6)	3,20	W31 – O4 (T22)	2,61		
W15 – N3 (a4)	2,66	W26 – O2 (T17)	2,74		
W16 – O2P (g6)	2,72	W32 – O3' (A24)	2,99		
W16 – O3' (g6)	3,39	W33 – O4' (A24)	3,25		
W16 – O2P (a7 II)	3,13	W33 – O2 (T23)	2,80		
W16 – N7 (a7 II)	3,41	W34 – O4' (T18)	3,41		
W17 – N7 (a10)	2,90	W35 – O4 (T21)	2,73		
W17– O2P (a10)	3,10	W39 – N4 (C19)	3,01		
W19 – N6 (a9)	2,83	W40 – O4 (T20)	2,70		
W20 – O2' (g11)	2,76	W41 – O2P (C19)	3,30		
W20 – O3' (g11)	3,20	W41 – O5' (C19)	3,50		
W31 – N6 (a2)	3,36	W43 – O1P (C19)	3,06		
W27 – N7 (a4)	2,93	W51 – O4 (T16)	2,72		
W27 – O2P (a4)	3,05	W58 – O2P (T17)	2,84		
W28 – N6 (a10)	3,01	W62 – O2 (T22)	2,91		
W29 – O1P (a8 I)	3,49	W62 – O4' (T23)	3,19		
W30 – O2P (g11)	2,72	W69 – O1P (C19)	3,14		
W31 – O2' (a4)	2,61				
W36 – N6 (a4)	2,95				
W44 – N7 (a10)	3,20				
W44 – N7 (g11)	2,99				
W46 – O6 (g11)	3,33				
W46 – O6 (g12)	3,26				
W48 – O2P (a10)	2,71				
W48 – O5' (a10)	3,38				
W48 – O2P (g11)	2,78				
W55 – O1P (g11)	2,76				
W60 – O1P (a3)	2,85				
W65 – O1P (a2 I)	3,23				
W65 – O1P (a2 II)	3,09				
W75 – O2P (a2 I)	2,52				
W75 – O2P (a2 II)	3,12				
W75 – O5' (a2 I)	3,19				
W76 – O2P (a7 I)	2,98				
W76 – O2P (a8 I)	2,71				



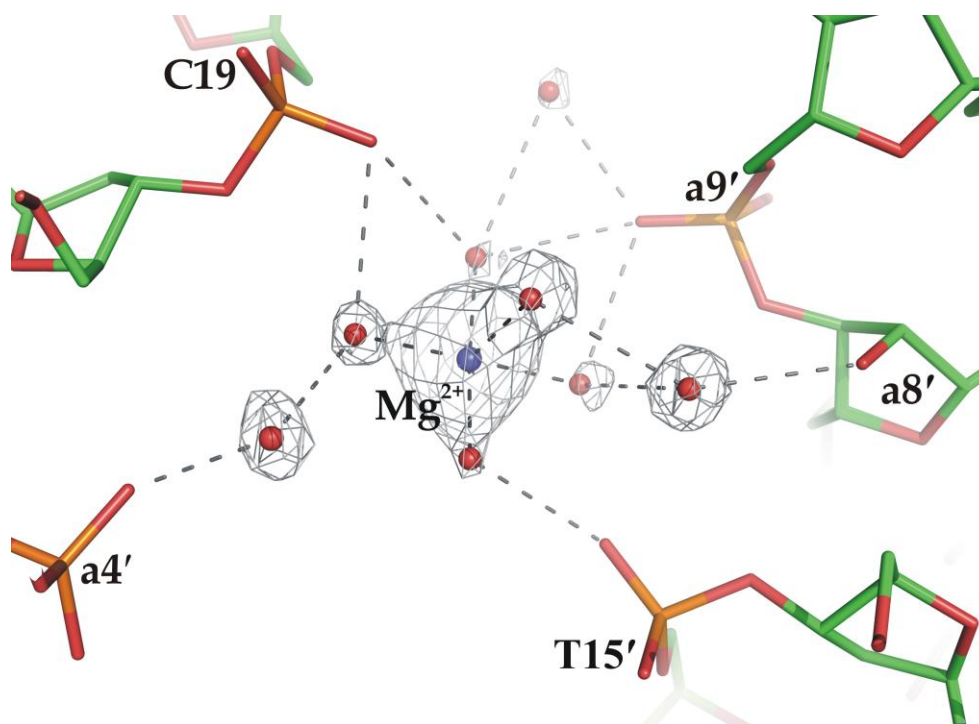
**Rys. 55.** Częsteczki wody (czerwone kule) w dużej bruździe duplexu RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>. Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Stwierdzono, że jony  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$  mają preferencje do wiązania się z guaniną w sekwencjach -gg- lub -gu- w dużej bruździe pseudowęzłów RNA, a także w dużej bruździe duplexów w formie A i B-DNA (sekwencja -GN-) (Egli, 2002). Układ krystalizacyjny dodekameru RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> zawierał także  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  (20 mM - kropla krystalizacyjna) o dwukrotnie wyższym stężeniu molowym niż  $\text{MgCl}_2$ . Nie udało się jednak znaleźć jonów kompleksowych  $\text{Co}^{3+}$  w gęstości elektronowej. Próby wprowadzenia takich jonów do modelu zawsze kończyły się pojawieniem ujemnej gęstości elektronowej na mapie  $Fo-Fc$  oraz wzrost wartości wskaźnika  $R_{\text{free}}$ . Z tych powodów jony  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  wyeliminowano z udokładnianego modelu, a pod uwagę wzięto jeszcze kationy  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$ . Ten tok postępowania doprowadził do stwierdzenia obecności w strukturze RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> trzech hydratowanych jonów  $\text{Mg}^{2+}$ , mających w sferze koordynacyjnej dwie, cztery lub pięć cząsteczek wody. Jon  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  [oznaczony także jako  $\text{Mg}^{2+}(1)$ ] jest zlokalizowany w dużej bruździe, oddziałując poprzez cząsteczki wody z atomami O6 i/lub N7 zasad g11, g12, oraz a10 (Rys. 56). Jon  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$  [oznaczony również jako  $\text{Mg}^{2+}(2)$ ] koordynuje do grup fosforanowych nukleotydu C19, a także

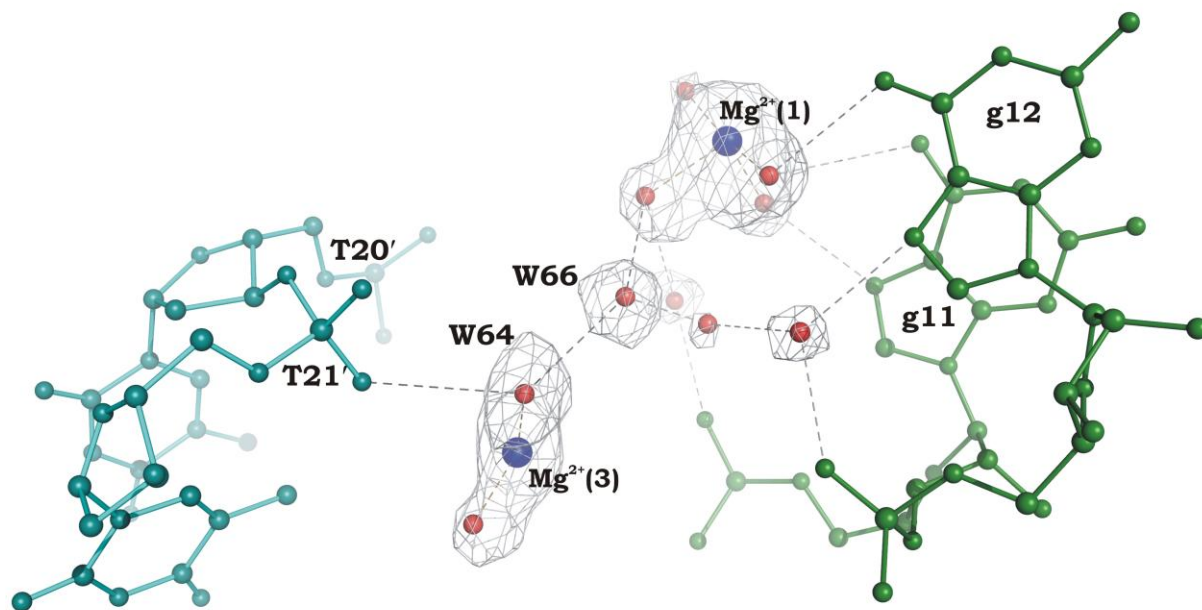
do symetrycznie równoważnych T15 i a9 (Rys. 57). Dla trzeciego kationu  $Mg^{2+}$  (3) mapa gęstości elektronowej pozwoliła na wymodelowanie tylko dwóch cząsteczek wody.



**Rys. 56.** Sfera hydratacyjna kompleksu  $[Mg(H_2O)_4]^{2+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .



**Rys. 57.** Sfera koordynacyjna kompleksu  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .



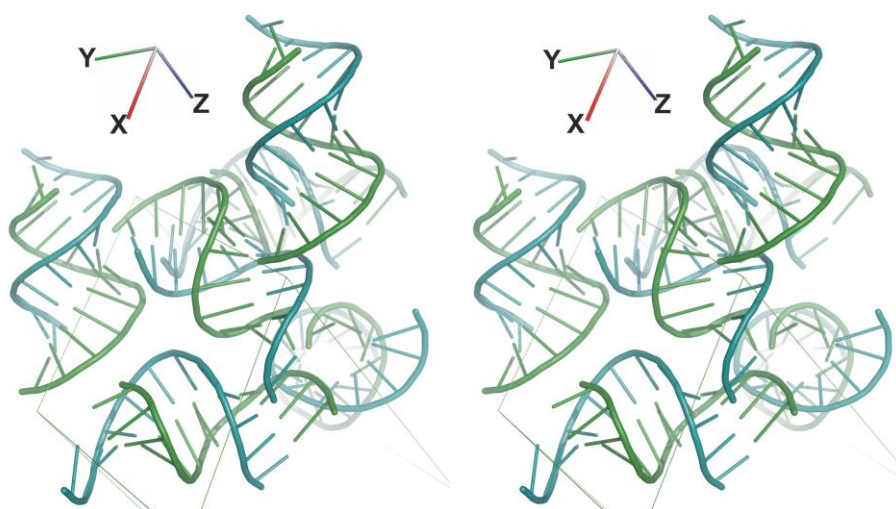
**Rys. 58.** Sfera hydratacyjna kompleksu  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ . Mapa gęstości elektronowej  $2Fo-Fc$ , kontur  $1\sigma$ .

Cząsteczka Wody66 tworzy wiązania wodorowe z Wodą64 ze sfery koordynacyjnej  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$  oraz Wodą45 z jonu  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ . Woda64 tworzy także wiązanie wodorowe z atomem O2P nukleotydu T21 z symetrycznie równoważnie cząsteczki RNA:DNA (Rys. 58).

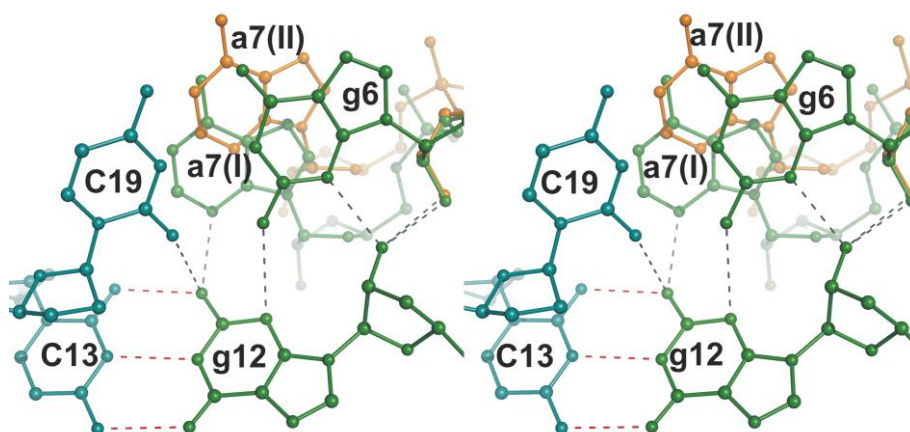
#### V.4.5 Upakowanie w sieci krystalicznej

Struktura hybrydy RNA:DNA- $\text{Mg}^{2+}$  wykazuje typowe dla A-DNA upakowanie w komórce elementarnej, gdzie końce jednej cząsteczki położone są w pobliżu bruzd innych symetrycznie równoważnych cząsteczek RNA:DNA (Rys. 59). Każda z cząsteczek dodekameru hybrydy otoczona jest w komórce elementarnej pięcioma dupleksami RNA:DNA. W sieci krystalicznej kontakty odbywają się głównie poprzez oddziaływania warstwowe terminalnych par zasad i pierścieni cukrów z małej bruzdy, przez wiązania wodorowe grup  $\text{O}2'$  nici RNA oraz międzycząsteczkowe oddziaływania tworzone przy udziale cząsteczek wody. Guanina 12 jest silnie zaangażowana w tworzenie wiązań wodorowych z symetrycznie równoważnymi nukleotydami g6, a7(I) i C19, formując pentapleks sparowanych zasad (Rys. 60). Atomy biorące udział w oddziaływaniach międzycząsteczkowych z sąsiadującymi ze sobą w komórce elementarnej dupleksów RNA:DNA są wymienione w Tabeli 36.





**Rys. 59.** Rysunek stereograficzny upakowania cząsteczek RNA:DNA w komórce elementarnej. Łańcuchy RNA pokazano są na zielono, a nici DNA na turkusowo.



**Rys. 60.** Rysunek stereograficzny oddziaływań w pentapleksie  $g6 \cdot a7 \cdot C19 \cdot (g12 \cdot C13)$ , będących konsekwencją upakowania typu A-DNA. Długości wiązań wodorowych zawarte są w przedziale 2,65 – 3,13 Å.

**Tabela 36.** Atomy biorące udział w oddziaływaniach pomiędzy cząsteczkami hybrydy RNA:DNA.

Część asymetryczna	Atom symetrycznie równoważny	Odległość (Å)
N3 (u1)	O3' (a10) (x-y+1, 1-y, 1/3+z)	2,94
O2' (a2)	O2' (a9) (x-y+1, 1-y, 1/3+z)	2,54
O2' (a3)	O4' (17T) (x-y+1, 1-y, 1/3+z)	3,15
O2' [g6(I)]	O2' (12g) (y-1, x, -z)	2,83
O2' [g6(II)]	O2' (12g) (y-1, x, -z)	3,13
N3 (g6)	O2' (12g) (y-1, x, -z)	2,65
N2 (g6)	N3 (12g) (y-1, x, -z)	3,08
O2' [a7(I)]	O4' (15T) (y-1, x, -z)	3,02
O2' [a7(II)]	O2 (14C) (y-1, x, -z)	2,72
O2' (a9)	O2' (a2(I)) (x-y, 1-y, 1/3-z)	3,35
O2' (a10)	N7 (A24) (x-y, 1-y, 1/3-z)	2,69
O3' (a10)	N3 (u1) (x-y, 1-y, 1/3-z)	3,25
O4' (g11)	N7 (A24) (x-y, 1-y, 1/3-z)	3,15
N2 (g12)	N3 (a7) (y, x+1, -z)	2,76
N2 (g12)	O2 (19C) (y, x+1, -z)	3,10
O4' (20T)	N1 (g12) (y-1, x, -z)	3,47
O2 (20T)	O3' (g12) (y-1, x, -z)	3,36
O3' (A24)	O2 (15T) (x-y+1, 1-y, 1/3-z)	3,19
N6 (A24)	O2' (a10) (x-y+1, 1-y, 1/3-z)	3,42
O3' (A24)	N2 (g11) (x-y+1, 1-y, 1/3-z)	3,46

#### V.4.6 Dyskusja wyników dla kompleksu RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup>

Rozwiązano i przeanalizowano strukturę dodekameru RNA:DNA-Mg<sup>2+</sup>, której łańcuch RNA stanowi 73% całości sekwencji polipurynowej (PPT) genomu wirusa HIV-1. Podwójna helisa hybrydy przybiera formę A i jest pod tym względem podobna do jedyne go opisanego wcześniej modelu dupleksu, o zbliżonej sekwencji nukleotydowej, zawierającej fragment PPT (Rys. 49, Kopka *i in.*, 2003). Jednakże analiza porównawcza obu tych struktur wykazała istotne różnice dotyczące parametrów helikalnych i konformacji kilku fragmentów nukleotydowych. Najważniejsza różnica w przedstawianym modelu hybrydy PPT to całkowity brak konformacji C2'-*endo* dla jakiegokolwiek pierścienia cukrowego RNA. Istnieniem takiej konformacji uzasadniano poprzednio odporność PPT na hydrolizę przez RNazę H. Ponadto duplekсы dekameru opisanego przez Kopkę *i in.*, 2003 i omawiany w tej pracy model dodekameru różnią się także innymi aspektami związanymi z konformacją nukleotydów łańcuchów RNA i DNA. Niniejsze wyniki wskazują na brak podwójnych konformacji w nici DNA oraz dla nukleotydu a3. Przedstawiona tu struktura wykazuje znaczną labilność szkieletu cukrowo-fosforanowego z sekwencją PPT, co uwiadcza się w kilku miejscach wzdłuż łańcucha RNA. W szczególności, podwójne konformacje nici RNA obecne są dla nukleotydów u1-a2 i g6-a8. Należy podkreślić,

że za wyjątkiem a7, zasady w tych fragmentach sekwencji są wyraźnie zdefiniowane w jednym tylko ustawieniu. Warto zaznaczyć, że sekwencja g6–a8 należy do tego fragmentu struktury kompleksu hybrydy RNA:DNA–RT/HIV-1, w którym zidentyfikowano niesparowane zasady (ang. *unzipping of the PPT*; Sarafianos *i in.*, 2001). Zasady u1(*anti*)·A24(*syn*) w badanym duplekcie RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> połączone są jednym (niekanonicznym) wiązaniem wodorowym, w którym kąt  $\chi$  dla A24 ma nietypową orientację *syn*. Właściwości nukleotydów u1(*anti*)·A24(*syn*) decydują o labilności końcowego fragmentu hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> i mają wpływ na kąty torsyjne sąsiedniego nukleotydu. Konformacja tego końcowego odcinka RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> sugeruje kierunek zmian parametrów helikalnych dupletu, które to mogą wystąpić w pobliżu nukleotydów mających słabo sparowane zasady. Tak znaczne zmiany obserwowane w prezentowanej strukturze w relacji do poprzednich danych (lokalne zmiany formy rybozy z A do B) jasno uwypuklają podatność sekwencji PPT na deformacje. Takie rearanżacje strukturalne mogą wystąpić w wielu miejscach łańcucha RNA i wydają się być warunkiem wstępnym dla efektywnego działania kwasu nukleinowego jako substratu w syntezie retrowirusowego DNA przez RT/HIV-1.

Cząsteczki wody z kompleksów [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>]<sup>2+</sup> zaangażowane są w liczne wiązania wodorowe z atomami zasad RNA [Mg<sup>2+</sup>(1)] i atomami tlenu grup fosforanowych [Mg<sup>2+</sup>(2)] hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>. Widoczna jest tu preferencja kationu [Mg(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> do wiązania się w dużej bruździe (sekwencja -gg-) cząsteczki dodekameru RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>.



## VI Podsumowanie i wnioski

Przeprowadzono badania krystalograficzne kompleksów kwasów nukleinowych z kationami organicznymi i nieorganicznymi. Uzyskane wyniki wzbogacają wiedzę o procesie odwrotnej transkrypcji w retrowirusach oraz o stabilności kwasu nukleinowego w formie Z-DNA. W przedstawionej pracy opisano wyniki badań i dyskusję dla następujących struktur:  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ ,  $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ ,  $d(CGCGCG)_2\text{-Cr}^{3+}$  oraz  $\text{RNA:DNA-Mg}^{2+}$ . Wszystkie podjęte zadania badawcze zrealizowano pomyślnie.

- Otrzymano monokryształy  $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$  oraz  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$
- Kryształy  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}$  zostały nasączone jonami  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cr}^{3+}$
- Zarejestrowano wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne i rozwiązano struktury kryształów nie opisywanych dotychczas w literaturze kompleksów:  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$ ,  $d(CGCGCG)_2\text{-Cr}^{3+}$  i  $d(CGCGCG)_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$
- Określono typ i miejsca wiązania się kationów metali i poliamin biogennych w powyższych kompleksach
- Zaobserwowano bezpośrednie wiązanie się kationów  $\text{Mn}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}(1)$  z atomem N7\_G6. Oba kationy mają oktaedryczną sferę koordynacyjną, w której pozostałe miejsca uzupełniają cząsteczki wody. Oktaedr przypisany  $\text{Mn}^{2+}$  jest zniekształcony w porównaniu z  $\text{Zn}^{2+}(1)$  na skutek alternatywnych położeń trzech skoordynowanych z nim cząsteczek wody.
- Dla jonu  $\text{Zn}^{2+}(2)$  stwierdzono mostkowanie atomów N7\_G10 i N7\_G12<sup>ii</sup> z symetrycznie równoważnych helis Z-DNA. Do tetraedrycznej sfery koordynacyjnej  $\text{Zn}^{2+}(2)$  należą także anion  $\text{Cl}^-$  i cząsteczka wody.
- Dla kompleksu  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  zaobserwowano odmienny, niespotykany dotąd w literaturze schemat oddziaływań sperminy<sup>4+</sup> z Z-DNA. W przeciwieństwie do innych kompleksów, spermina<sup>4+</sup> tworzy wiązania wodorowe tylko z grupami fosforanowymi Z-DNA.
- Dokonano porównania wartości parametrów helikalnych i kątów w szkieletcie cukrowo-fosforanowym helis  $d(CGCGCG)_2$  w kompleksach Z-DNA-kationy<sup>n+</sup>, którego celem było określenie wpływu poszczególnych jonów na konformację kwasu nukleinowego we fragmentach, w których zlokalizowano kationy metali. Porównując strukturę z  $d(CGCGCG)_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  [gdzie odnotowano wiązanie N7\_G10- $\text{Zn}^{2+}(2)$ ], z pozostałymi układami z Z-DNA, stwierdzono istotne różnice w parametrach helikalnych dla środkowego

dinukleotydu helisy Z-DNA. Określono, że wartość kąta  $\beta$  (Rys. 4), dla nukleotydu C5 jest inna w kompleksie z  $Mn^{2+}$  niż z  $Zn^{2+}$ , co jest wynikiem tworzenia wiązania wodorowego przez atom O2P\_C5, odpowiednio ze sperminą<sup>4+</sup> lub cząsteczką H<sub>2</sub>O. Poza stabilizacją przez akwakompleksy metali nici Z-DNA w pojedynczej konformacji Z<sub>II</sub>, odnotowano, że podwójne konformacje Z-DNA związane są z tendencją szkieletu cukrowo–fosforanowego do zapewnienia efektywnej hydratacji dla obu alternatywnych pozycji grupy fosforanowej. W szczególności sytuację taką zaobserwowano w kompleksach z d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Cr<sup>3+</sup> oraz d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup>. Za wyjątkiem kompleksu z  $Mn^{2+}$ , w pozostałych strukturach z Z-DNA łańcuch kwasu nukleinowego wykazuje nieuporządkowanie (podwójne konformacje), którego stopień można uszeregować w następującej kolejności d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Cr<sup>3+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> > d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup>.

- Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty świadczą o wysokim stopniu labilności konformacyjnej helisy Z-DNA. Labilność ta zależy od otoczenia jonowego (kationy metali i poliaminy<sup>n+</sup>) wokół dupleksu Z-DNA. Informacje te pozwalają ocenić rolę kationów organicznych i nieorganicznych w promowaniu i stabilizacji tworzącego się w procesie transkrypcji Z-DNA. Jest to ważne ze względu na zależność pomiędzy położeniem w genomie człowieka regionów podatnych na tworzenie się Z-DNA, a lokalizacją genów (Champ *i in.*, 2004).

- Wysokorozdzielcze dane dyfrakcyjne dla kompleksów d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup>, d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> i d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> pozwoliły na obliczenie jednego cyklu pełnomacierzowego udokładniania metodą najmniejszych kwadratów w celu wyznaczenia odchyłeń standardowych dla wszystkich indywidualnie udokładnianych parametrów i wszystkich parametrów geometrycznych. Spośród wszystkich prac krystalograficznych rozpatrujących addukty Z-DNA–kationy<sup>n+</sup>, takie obliczenia wykonano poprzednio tylko dla trzech innych struktur Z-DNA.

- Po raz pierwszy opisano położenie i kontakty międzycząsteczkowe putrescyny<sup>2+</sup> z Z-DNA w komórce elementarnej. Mający podwójną konformację kation Put<sup>2+</sup> efektywnie oddziałuje poprzez wiązania wodorowe z atomami N7\_G i cząsteczkami wody stabilizując tym samym strukturę i upakowanie dupleksów Z-DNA.

- W strukturze krystalicznej d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Put<sup>2+</sup>–K<sup>+</sup> zlokalizowano kation K<sup>+</sup>, czego dotąd nie opisano w literaturze prezentującej wyniki badań układów z tą formą DNA. Jon potasu oddziałuje niekowalencyjnie z cząsteczkami wody i atomami tlenu dwóch grup fosforanowych Z-DNA.

- Analiza kontaktów międzycząsteczkowych dla  $\text{Put}^{2+}$  i  $\text{K}^+$  wykazała ich mniejszą efektywność w porównaniu z kompleksami  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$  i  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  w stabilizacji konformacji  $\text{Z}_{\text{II}}$  grupy fosforanowej ulokowanej pomiędzy nukleotydami G4–C5.
- Po raz pierwszy określono strukturę kompleksu  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Cr}^{3+}$ . Dla żadnego z trzech hydratowanych kationów  $\text{Cr}^{3+}$  nie stwierdzono bezpośredniego wiązania z donorowymi atomami Z-DNA.
- Dla kompleksu z kationami  $\text{Cr}^{3+}$  odnotowano typ B upakowania cząsteczek w sieci krystalicznej o symetrii  $P2_12_12_1$  w przeciwieństwie do struktur  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Mn}^{2+}$ ,  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Spm}^{4+}\text{-Zn}^{2+}$  oraz  $\text{d}(\text{CGCGCG})_2\text{-Put}^{2+}\text{-K}^+$ , które mają typ A.
- Otrzymano kryształy i zmierzono dane dyfrakcyjne dla kompleksu RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$ , w którym łańcuch RNA (dodekamer) zawiera sekwencję polipurynową wirusa HIV-1 (PPT).
- Uzyskane rezultaty dla RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$  dotyczące konformacji i parametrów helikalnych porównano z wartościami charakteryzującymi dwa, jak dotąd, opisane duplekisy RNA:DNA z sekwencją analogiczną do PPT. Wyniki dla przedstawionej tu struktury RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$  zestawiano głównie z tymi odnotowanymi dla dekameru (Kopka *i in.*, 2003) oraz w mniejszym stopniu dla hybrydy z kompleksu RNA:DNA–RT/HIV-1 (Sarafianos *i in.*, 2001).
- Powyższa analiza porównawcza wykazała różnice w konformacji cukrów, stopniu nieuporządkowania nici RNA, oddziaływaniach warstwowych w regionie a5-g6-a7 i w trajektorii osi helisy.
- W analizowanym kompleksie RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$  połączona jednym wiązaniem wodorowym niekanoniczna para zasad  $\text{u1}(\text{anti})\cdot\text{A24}(\text{syn})$  wpływa na kąty torsyjne sąsiedniego nukleotydu.
- Na mapie gęstości elektronowej struktury RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$  zidentyfikowano trzy jony  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_n]^{2+}$  oddziałujące pośrednio poprzez cząsteczki wody z grupami fosforanowymi DNA lub zasadami RNA. Kation  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  preferencyjnie wiąże się w dużej bruździe hybrydy RNA:DNA, podobnie jak ma to miejsce dla A-RNA, A-DNA czy B-DNA. Pomimo dwukrotnie większego stężenia  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  w stosunku do  $\text{MgCl}_2$  w układzie krystalizacyjnym, mapa gęstości elektronowej wykluczyła specyficzne wiązania się  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  z cząsteczką hybrydy RNA:DNA.
- Wnioski z badań nad kompleksem RNA:DNA– $\text{Mg}^{2+}$ , w porównaniu do rezultatów opisanych przez Kopkę *i in.*, (2003) i Sarafianosa *i in.*, (2001), wyraźnie uwidaczniają podatność sekwencji PPT na zmiany konformacyjne szkieletu cukrowo–fosforanowego.

Przekształcenia strukturalne stwierdzone w powyższych układach występują w wielu miejscach łańcucha RNA z sekwencją PPT, co sugeruje, że są jednym z warunków wstępnych w efektywnej syntezie retrowirusowego DNA przez RT/HIV-1. Ponadto wpływ pary u1(*anti*)·A24(*syn*) na sąsiedni nukleotyd a2 może być przykładem rearanżacji, jakie mogą zachodzić w obrębie dwunukleotydowych fragmentów dupleksów kwasów nukleinowych, które zaangażowane są w niekanoniczne parowanie zasad. Powyższe wnioski mogą mieć znaczenie w poznaniu mechanizmu wieloetapowego procesu odwrotnej transkrypcji, szczególnie dla opisu degradacji matrycowej nici RNA przez RNazę H retrowirusów.

Zdeponowano w bazie PDB następujące struktury

RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup> (kod PDB: 3ssf, kod NDB: NA1220)

d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> (kod PDB: 4hig, kod NDB: NA2072)

d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup> (kod PDB: 4hif, kod NDB: NA2073)

Wyniki dotyczące hybrydy RNA:DNA–Mg<sup>2+</sup>, a także kompleksów Z-DNA [d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Mn<sup>2+</sup> oraz d(CGCGCG)<sub>2</sub>–Spm<sup>4+</sup>–Zn<sup>2+</sup>], opublikowano w dwóch pracach w *Acta Crystallographia Section D*, Biological Crystallography (IF = 14,1).

1) Drozdal, P., Michalska, K., Kierzek, R., Łomozik, L. & Jaskolski, M. (2012). Structure of an RNA/DNA dodecamer corresponding to the HIV-1 polypurine tract at 1.6 Å resolution *Acta Cryst.* **D68**, 169–175.

2) Drozdal, P., Gilski, M., Kierzek, R., Łomozik, L. & Jaskolski, M. (2013). Ultrahigh-resolution crystal structures of Z-DNA in complex with Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions *Acta Cryst.* **D69**, 1180–1190.

Tematyce oddziaływań kationów organicznych i nieorganicznych z kwasami nukleinowymi poświęcono także artykuł

3) Łomozik, L., Drozdal, P., Kierzek, R. (2009). Oddziaływania DNA i RNA z kationami metali i poliaminami *Na pograniczu chemii i biologii*, **22**, 81–104, UAM Wydawnictwo Naukowe, Poznań.

Wystąpienia na konferencjach naukowych:

1) Drozdzał, P., Michalska, K., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Crystal structure of DNA:RNA dodecamer corresponding to HIV-1 polypurine tract, at 1.6 Å resolution

CSCM20-Croatian-Slovenian crystallographic meeting, 15-19 VI 2011, Baška, Croatia.

2) Drozdzał, P., Michalska, K., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Crystal structure of DNA:RNA dodecamer corresponding to HIV-1 polypurine tract, at 1.6 Å resolution

14th Heart of Europe bio-Crystallography Meeting, 29 IX - 1 X 2011, Żagań, Poland

Przedstawione komunikaty posterowe:

1) Łomozik, L., Gąsowska, A. & Drozdzał, P.

Oddziaływania DNA z miedzią(II) i tetraaminami

51 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, 7-11 IX, 2008, Opole.

2) Lomozik, L., Gasowska, A. & Drozdzał, P.

Spectral, microscopic and potentiometric studies on the interaction in the nucleic acid/polyamine/Cu(II) systems

17<sup>th</sup> International Microscopy Congress (IMC17), 19-24 IX 2010, Rio de Janeiro, Brazil.

3) Drozdzał, P., Michalska, K., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Crystal structure of DNA:RNA dodecamer corresponding to HIV-1 polypurine tract, at 1.6 Å resolution

Sesja sprawozdawcza, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, 15 IV 2011, Poznań.

4) Drozdzał, P., Michalska, K., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Crystal structure of DNA:RNA dodecamer corresponding to HIV-1 polypurine tract, at 1.6 Å resolution

53 Konwersatorium Krystalograficzne, 30 VI - 1 VII 2011, Wrocław.

5) Drozdzał, P., Gilski, P., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Ultrahigh-resolution crystal structures of Z-DNA in complex with Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions.

1 st Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, 11-14 IX 2012, Poznań, Poland.

6) Drozdal, P., Gilski, M., Kierzek, R., Lomozik, L. & Jaskolski, M.

Ultrahigh-resolution crystal structures of Z-DNA in complex with  $Mn^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions.

55 Konwersatorium Krystalograficzne, 27-29 VI 2013, Wrocław.

7) Gilski, M., Drozdal, P. & Jaskolski, M.

High-resolution crystal structure of Z-DNA in complex with  $Ba^{2+}$  ions: a case of multidomain twinning.

11th International Conference on Biology and Synchrotron Radiation, 8-11 IX 2013, Hamburg, Germany.

*Praca była współfinansowana przez Ministerstwo Edukacji Narodowej i Szkolnictwa Wyższego w ramach Grantu NN 204 001736.*

## VII Bibliografia

Aich, P., Labiuk, S. L., Tari, L. W., Delbaere, L. J. T., Roesler, W. J., Falk, K. J., Steer, R. P., Lee, J. S. (1999). *Nucleic Acids Res.* **30**, 2244–2250.

Allen, F. H. (2002). *Acta Cryst.* **B58**, 380–388.

Allen, F. H., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G. & Taylor, R. (2006). *International Tables for Crystallography*, **Vol. C**, pp. 790–811. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Altona, C. & Sundaralingam, M. (1972). *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 8205–8212.

Amarantos, I. & Kalpaxis, D. L. (2000). *Nucleic Acids Res.* **28**, 3733–3742.

Amarantos, I., Zarkadis, I. K. & Kalpaxis, D. L. (2002). *Nucleic Acids Res.* **30**, 2832–2843.

Anastassopoulou, J. (2003). *J. Mol. Struct.* **651–653**, 19–26.

Anderson, R. A. (2000). *Diabetes Metab.* **26**, 22–27.

Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M. & Tajmyr-Riahi, H. A. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 10150–10153.

Arndt-Jovin, D. J., Udvardy, A., Garner, M. M., Ritter, S. & Jovin, T. M. (1993). *Biochemistry*, **32**, 4862–4872.

Arnott, S. (1999). *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*, edited by S. Neidle, pp. 1–38. Oxford University Press.

Arndt, J. W., Gong, W., Zhong, X., Showalter, A. K., Liu, J., Dunlap, Ch. A., Lin, Z., Paxson, Ch., Tsai, M.-D. & Chan, M. K. (2001). *Biochemistry*, **40**, 5368–5375.

Astell, C. R., Smith, M., Chow, M. B. & Ward, D. C. (1979). *Cell*, **17**, 691–703.

Auffinger, P., Grover, N. & Westhof, E. (2011). *Metal Ions in Life Sciences*, **Vol. 9**, 1–35.

Bae, S., Kim, D., Kim, K. K., Kim, Y.-G. & Hohng, S. (2011). *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 668–671.

Bancroft, D., Williams, L. D., Rich, A. & Egli, M. (1994). *Biochemistry*, **33**, 1073–1086.

Berger, I., Kang, C. H., Sinha N, Wolters, M. & Rich, A. (1996). *Acta Cryst.* **D52**, 465–468.

Berman, H. M., Olson, W. K., Beveridge, D. L., Westbrook, J., Gelbin, A., Demeny, T., Hsieh,

- S.-H., Srinivasan, A. R. & Schneider, B. (1992). *Biophys. J.* **63**, 751–759.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
- Bernues, J., Beltran, R., Casasnovas, J. M. & Azorin, F. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 4067–4073.
- Beyersmann, D. & Koster, A. (1987). *Toxicol. Environ. Chem.* **14**, 11–22.
- Bharanidharan, D., Thiagarajan, S. & Gautham, N. (2007). *Acta Cryst.* **F63**, 1008–1013.
- Bibillo, A., Figlerowicz, M. & Kierzek, R. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 3931–3937.
- Blaho, J. A. & Wells, R. D. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 6082–6088.
- Bloomfield, V. A. (1997). *Biopolymers*, **44**, 269–282.
- Bock, C. W., Katz, A. K., Markham, G. D. & Glusker, J. P. (1999). *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7360–7372.
- Boiteux, S., de Costa Oliveira, R. & Laval, J. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 8711–8715.
- Borgstahl, G. E., Pokross, M., Chehab, R., Sekher, A. & Snell, E. H. (2000). *J. Mol. Biol.* **296**, 951–959.
- Brehler, B. (1961). *Z. Kristallogr.* **115**, 373–402.
- Brese, N. E. & O’Keefe, M. (1991). *Acta Cryst.* **B47**, 192–197.
- Brooks, W. H. (2013). *Front. Immunol.* **4**:91. 1–8.
- Brown, B. A. & Rich, A. (2001). *Acta Biochem. Pol.* **48**, 295–312.
- Brünger, A. T. (1992). *Nature (London)*, **355**, 472–475.
- Bryszewska, M. & Leyko, W. (2000). *Biofizyka kwasów nukleinowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Brzezinski, K., Brzuszkiewicz, A., Dauter, M., Kubicki, M., Jaskolski, M. & Dauter, Z. (2011). *Nucleic Acids Res.* **39**, 6238–6248.
- Bujacz, G., Jaskolski, M., Alexandratos, J., Wlodawer, A., Merkel, G., Katz, R. A. & Skalka, A. M. (1996). *Structure*, **15**, 89–96.
- Bukowiecka-Matusiak, M. & Woźniak, L. A. (2006). *Postępy Biochemii*, **52**, 1–10.
- Bullock, S. L., Ringel, I., Ish-Horowicz, D. & Lukavsky, P. J. (2010). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 703–709.



- Carell, T., Brandmayr, C., Hienzsich, A., Müller, M., Pearson, D., Reiter, V., Thoma, I., Thumbs, P. & Wagner, M. (2012). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **51**, 7710–7131.
- Champ, P. Ch., Maurice, S., Vargason, J. M., Camp, T. & Ho, P. S. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, 6501–6510.
- Champoux, J. J. & Schultz, S. J. (2008). *Virus Res.* **134**, 86–103.
- Champoux, J. J. & Schultz, S. J. (2009). *FEBS J.* **276**, 1506–1516.
- Chevrier, B., Dock, A. C., Hartmann, B., Leng, M., Moras, D., Thuong, M. T. & Westhof, E. (1986). *J. Mol Biol.* **188**, 707–719.
- Choi, J. & Majima, T. (2011). *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5893–5909.
- Chou, S. H., Chin, K. H., Wang, A. H. (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**, 2461–2474.
- Christian, E. L., Smith, K. M. J., Perera, N. & Harris, M. E. (2006). *RNA*, **12**, 1463–1467.
- Clowney, L., Jain, S. C., Srinivasan, A. R., Westbrook, J., Olson, W. K. & Berman, H. M. (1996). *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 509–518.
- Coben, S. S. (1998). *A guide to the polyamines*, Oxford University Press. New York.
- Conn, G. L., Brown, T. & Leonard, G. A. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 555–561.
- Cowan, J. A. (1998). *Chem. Rev.* **98**, 1067–1088.
- Cromer, D. T. (1983). *J. Appl. Cryst.* **16**, 437.
- Cross, C. W., Rice, J. S. & Gao, X. (1997). *Biochemistry*, **36**, 4096–4107.
- Davies, J. F., II, Hostomska, Z., Hostomsky, Z., Jordan, S. R. & Matthews, D. A. (1991). *Science*, **252**, 88–95.
- Deaton, A. M. & Bird, A. (2011). *Genes Dev.* 1010–1022.
- DeLano, W. L. (2002). *PyMOL*. <http://www.pymol.org>.
- Deng, J., Xiong Y., Sudarsanakumar, Ch., Shi, K. & Sundaralingam, M. (2001), *RNA*, **7**, 1425–1431.
- de Rosa, M., de Sanctis, D., Rosario, A. L., Archer, M., Rich, A., Athanasiadis, A. & Carrondo, M. A. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 9088–9092.
- de Rosa, M., Zacarias, S. & Athanasiadis, A. (2013). *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkt743, 1–10.
- DeRose, V. J. (2003). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 317–324.

- Dickerson, R. E. (1989a). *Nucl. Acids Res.* **17**, 1797–1803.
- Dickerson, R. E. (1989b). *EMBO J.* **8**, 1–4.
- Draper, D. E. (2004). *RNA*, **10**, 335–343.
- Duguid, J., Bloomfield, V. A., Benevides, J. & Thomas Jr, G. J. (1993). *Biophys. J.* **65**, 1916–1928.
- Earnshaw, D. J. & Gait, M. J. (1998). *Nucleic Acids Res.* **26**, 5551–5561.
- Egli, M., Williams, L. D., Gao, Q. & Rich, A. (1991). *Biochemistry*, **30**, 11388–11402.
- Egli, M. (2002). *Chem. Biol.* **9**, 277–286.
- Egli, M., Portmann, S. & Usman, N. (1996). *Biochemistry*, **35**, 8489–8494.
- Eichman, B. F., Schroth, G. P., Basham, B. E. & Ho, P. S. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 543–550.
- El Hassan, M. A. & Calladine, C. R. (1998). *J. Mol. Biol.* **282**, 331–343.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 486–501.
- Ennifar, E. & Dumas, P. (2006). *J. Mol. Biol.* **356**, 771–782.
- Ennifar, E., Walter P. & Dumas, P. (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**, 2671–2682.
- Fedoroff, O. Y., Salazar, M. & Reid, B. R. (1993). *J. Mol. Biol.* **233**, 509–523.
- Feng, Z., Westbrook, J. & Berman, H. M. (1998). *Report NDB-407*. Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, USA.
- Fraustro da Silva, J. J. R. & Williams, R. J. P. (2001). *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, p. 265. Oxford University Press.
- Frydman, L., Rossomando, P. C., Frydman, V., Fernandez, C. O., Frydman, B. & Samejima, K. (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 9186–9190.
- Frydman, B., Westler, W. M. & Samejima, K. (1996). *J. Org. Chem.* **61**, 2588–2589.
- Fujiwara, K., Bai, G., Kitagawa, T. & Tsuru, D. (1998). *J. Histochem. Cytochem.* **46**, 1321–1328.
- Gao, Y.-G., Sriram, M. & Wang, A. H.-J. (1993). *Nucleic Acids Res.* **21**, 4093–4101.
- Geierstanger, B. H., Kagawa, T. F., Chen, S.-L., Quigley, G. J. & Ho, P. S. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 20185–20191.
- Gelbin, A., Schneider, B., Clowney, L., Hsieh, S., Olson, W. K. & Berman, H. M. (1996). *J. Am.*

*Chem. Soc.* **118**, 519–529.

Gessner, R. V., Frederick, C. A., Quigley, G. J., Rich, A. & Wang, A. H.-J. (1989). *J. Biol. Chem.* **264**, 7921–7935.

Gessner, R. V., Quigley, G. J., Wang, A. H.-J., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. & Rich, A. (1985). *Biochemistry*, **24**, 237–240.

Ghosh, A. & Bansal, M. (2003). *Acta Cryst.* **D59**, 620–626.

Guerra, C. F., Bickelhaupt, F. M., Snijders, J. G. & Baerends, E. J. (2000). *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4117–4128.

Ha, S. Ch., Lowenhaupt, K., Rich, A., Kim, Y.-G. & Kim, K. K. (2003). *Nature*, **437**, 1183–1186.

Harper, A., Brannigan, J. A., Buck, M., Hewitt, L., Lewis, R. J., Moore, M. H. & Schneider, B. (1998). *Acta Cryst.* **D54**, 1273–1284.

Heinemann, U., Lauble, H., Frank, R. & Blöcker, H. (1987). *Nucleic Acids Res.* **15**, 9531–9550.

Herbert, A. G. & Rich, A. (1996). *J. Mol. Biol.* **271**, 11595–11598.

Herbert, A. G., Spitzner, J. R., Lowenhaupt, K. & Rich, A. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 3339–3342

Higashi, K., Terui, Y., Inomata, E., Katagiri, D., Nomura, Y., Someya, T., Nishimura, K., Kashiwagi K., Kawai, G. & Igarashi, K. (2008). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **370**, 572–577.

Ho, P. S., Frederick, C. A., Saal, D., Wang, A. H.-J. & Rich, A. (1987). *J. Biomol. Struct. Dyn.* **4**, 521–534.

Ho, P. S. & Mooers, B. H. M. (1997). *Biopolymers*, **44**, 65–90.

Hoogsteen, K. (1959). *Acta Cryst.* **12**, 822–823.

Hoogsteen, K. (1963). *Acta Cryst.* **16**, 907–916.

Howell, M. L., Schroth, G. P. & Ho, P. S. (1996). *Biochemistry*, **35**, 15373–15382.

Hud, N. V. (2009). *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*. Edited by Royal Society of Chemistry Publishers.

Iacomino, G., Picariello, G. & D’Agostino, L. (2012). *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 1745–1755.

Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2006). *J. Biochem.* **139**, 11–16.

Igarashi, K. & Kashiwagi, K. (2000). *Biophys. Res. Commun.* **271**, 559–564.

Illingworth, R. S. & Bird, A. P. (2009). *FEBS Lett.* **583**, 1713–1720.

- Ilyinskii, P. O. & Desrosiers, R. C. (1998). *EMBO J.* **17**, 3766–3774.
- Isono, K. & Yourno, J. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **71**, 1612–1617.
- Jacewicz, D., Wyrzykowski, D., Żamojć, K & Chmurzyński, L. (2012). *Na pograniczu chemii i biologii*, **29**, 199–209. UAM Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
- Jain, S., Zon, G. & Sundaralingman, M. (1989). *Biochemistry*, **28**, 2360–2364.
- Jaskólski, M. (1984). *Acta Cryst.* **A40**, 364–366.
- Jaskólski, M. (2010). *Krystalografia dla biologów*, UAM Wydawnictwo Naukowe, Poznań.
- Jean, Y.-C., Gao, Y.-G. & Wang, A. H.-J. (1993). *Biochemistry*, **32**, 381–388.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Kagawa, T. F., Geierstanger, B. H., Wang, A. H.-J. & Ho, P. S. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 20175–20184.
- Kankia, B. I., Buckin, V. & Bloomfield, V. A. (2001). *Nucleic Acids Res.* **29**, 2795–2801.
- Kennard, O. & Hunter, W. N. (1991). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**, 1254–1277.
- Kim, S. H., Shin, W. C. & Warrant, R.W. (1985). *Methods Enzymol.* **114**, 156–167.
- Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). *Acta Cryst.* **D52**, 826–828.
- Klumpp K., Hang J. Q., Rajendran, S., Yang, Y., Derosier, A., Wong Kai In, P., Overton H., Parkes K. E. B., Cammack, N. & Martin, J. A. (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**, 6852–6859.
- Kopka, M. L., Lavelle, L., Han, G. W., Ng, H. L. & Dickerson, R. E. (2003). *J. Mol. Biol.* **334**, 653–665.
- Krishna, P., Kennedy, B. P., Waisman, D. M., van de Sande, J. H. & McGhee, J. D. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 1292–1295.
- Kwon, J. A. & Rich, A. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 12759–12764.
- Lafer, E. M., Moller, A., Nordheim, A., Stollar, B. D. & Rich, A. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**, 3546–3550.
- Lafer, E. M., Sousa, R., Rosen, B., Hsu, A. & Rich, A. (1985). *Biochemistry*, **24**, 5070–5076.
- Lafer, E. M. Sousa, R. & Rich, A. (1988). *J. Biol. Mol.* **203**, 511–516.
- Lagravere, C., Malfoy B., Leng, M. & Laval, J. (1984). *Nature*, **310**, 798–800.
- Lavery, R., Moakher, M., Maddocks, J. H., Petkeviciute, D. & Zakrzewska, K. (2009). *Nucleic Acids Res.* **37**, 5917–5929.

- Lee, J. S., Latimer, J. P. & Reid, R. S. (1993). *Biochem. Cell Biol.* **71**, 162–168.
- Leith, I. R., Hay, R. T. & Russell, W. C. (1988). *Nucleic Acids Res.* **16**, 8277–8289.
- Leontis, N. B., Stombaugh, J. & Westhof, E. (2002). *Nucleic Acids Res.* **30**, 3497–3531.
- Li, P. T. X., Viereggs, J. & Tinoco Jr, I. (2008). *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 77–100.
- Liu, Y., Wolff, K. C., Jacobs, B. L. & Samuel, C. E. (2001). *Virology*, **289**, 378–387.
- Lomozik, L., Gasowska, A., Bregier-Jarzebowska, R. & Jastrzab, R. (2005). *Coord. Chem. Rev.* **249**, 2335–2350.
- Lu, X.-J. & Olson, W. K. (2003). *Nucleic Acids Res.* **31**, 5108–5121.
- Ma, Ch. & Bloomfield, V. (1994). *Biophys. J.* **67**, 1678–1681.
- Mandal, P. K., Venkadesh, S. & Gautham, N. (2008). *J. Indian Inst. Sci.* **88**, 73–93.
- Mandal, P. K., Venkadesh, S. & Gautham, N. (2012). *Acta Cryst.* **F68**, 1420–1426.
- Matthews, L. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). *J. Appl. Cryst.* **40**, 658–674.
- Millonig, H., Pous, J., Gouyette, C., Subirana, J. A. & Campos, J. L. (2009). *J. Inorg. Biochem.* **103**, 876–880.
- Mueller, U., Darowski, N., Fuchs, M. R., Förster, R., Hellmig, M., Paithankar, K. S., Pühringer, S., Steffien, M., Zocher, G. & Weiss, M. S. (2012). *J. Synchrotron Rad.* **19**, 442–449.
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 355–367.
- Müller, P., Spek, A. L., Schneider, T. R. & Sawaya, M. R., (2006). *Crystal Structure Refinement. A Crystallographer's Guide to SHELXL*, pp. 15–22. Oxford University Press.
- Nagaswamy, U., Voss, N., Zhang, Z. & Fox, G. E. (2000). *Nucleic Acids Res.* **28**, 375–376.
- Narayanan, B. C., Westbrook, J., Ghosh, S., Petro, A. I., Sweeney, B., Zirbel, C. L., Leontis, N.B. & Berman, H. M. (2013). *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkt980, 1-9.
- Neidle, S. (2008). *Principles of Nucleic Acid Structure*, p. 33. Academic Press, London.
- Ng, S. K., Weissbach, R., Ronson, G. E. & Scadden, A. D. J. (2013). *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkt750, 1–14.
- Nordheim, A., Pardue, M. L., Lafer, E. M., Moller, A., Stollar, B. D. & Rich, A. (1981). *Nature*, **294**, 417–422.

- Nordheim, A., Tesser, P., Azorin, F., Kwon, Y. H., Moller, A. & Rich, A. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79**, 7729–7733.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J. & Yang, W. (2005). *Cell*, **121**, 1005–1016.
- Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Ghirlando, R., Cerritelli, S. M., Crouch, R. J. & Yang, W. (2007). *Mol. Cell*. **28**, 264–276.
- Nowotny, M. & Yang, W. (2006). *EMBO J*. **25**, 1924–1933.
- Ohishi, H., Nakanishi, I., Inubushi, K., van der Marel, G., van Boom, J. H., Rich, A. Wang, A. H. J., Hakoshima, T. & Tomita, K. (1996). *FEBS Lett*. **391**, 153–156.
- Ohishi, H., Tozuka, Y., Da-Yang, Z., Ishida, T. & Nakatani, K. (2007). *Biochem. Biophys. Res. Commun Biochemical*. **358**, 24–28.
- Olive, J. E. & Collins, R. A. (1998). *Biochemistry*, **37**, 6476–6484.
- Olson, W. K., Bansal, M., Burley, S. K., Dickerson, R. E., Gerstein, M., Harvey, S. C., Heinemann, U., Lu, X-J., Neidle, S., Shakked, Z., Sklenar, H., Suzuki, M., Tung, Ch.-Sh., Westhof, E., Wolberger, C. & Berman, H. M. (2001). *J. Mol. Biol*. **313**, 229–237.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods Enzymol*. **276**, 307–326.
- Ouameur, A. A., Bourassa, P. & Tajmir-Riahi, H.-A. (2010) *RNA*, **16**, 1968–1979.
- Painter, J. & Merritt, E. A. (2006). *J. Cryst*. **39**, 109–111.
- Panagiotidis, C. A., Artandi, S., Calame, K. & Silverstein, S. J. (1995). *Nucleic Acids Res*. **23**, 1800–1809.
- Parkinson, G. N., Arvanitis, G. M., Lessinger, L., Ginell, S. L., Jones, R., Gaffney, B. & Berman, H. M. (1995). *Biochemistry*, **34**, 15487–15495.
- Parkinson, G., Vojtechovsky, J., Clowney, L., Brünger, A. T. & Berman, H. M. (1996). *Acta Cryst. D***52**, 57–64.
- Peck, L. J. & Wang, J. C. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**, 6206–6210.
- Peck, L. J. & Wang, J. C. (1985). *Cell*, **40**, 129–137.
- Pham, H. T., Park, M. Y. Kim, K. K. Kim, Y. G. & Ahn, J. H. (2006). *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **348**, 145–152.
- Pospieszna-Markiewicz, I., Radecka-Paryzek, W. & Kubicki, M. (2007). *Acta Cryst. E***63**, o3650.
- Pyle, A. M. (2002). *J. Biol. Inorg. Chem*. **7**, 679–690.
- Rattray, A. J. & Champoux, J. J. (1989). *J. Mol. Biol*. **208**, 445–456.

- Rhee, S., Han, Zj., Liu, K., Miles, H. T. & Davies, D. R. (1999). *Biochemistry*, **38**, 16810–16815.
- Rich, A. & Zhang, S. (2003). *Nat. Rev. Genet.* **4**, 566–572.
- Richmond, T. J. & Davey, C. A. (2003). *Nature*, **423**, 145–150.
- Rohner, K. J., Hobi, R. & Kuenzle, C. C. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 19112–19115.
- Rothenburg, S., Schwartz, T., Koch-Nolte, F. & Haag, F. (2002). *Nucleic Acids Res.* **30**, 993–1000.
- Rothenburg, S., Deigendesch, N., Dittmar, K., Koch-Nolte, F., Haag, F., Lowenhaupt, K. & Rich, A. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 1602–1607.
- Sacharczuk, M., Jaszczask, K. & Świergiel, A. H. (2004). *Kosmos*, **53**, 147–154.
- Saenger, W. (1984). *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer, New York.
- Sarafianos, S. G., Das, K., Tantillo, C., Clark, A. D., Ding, J., Whitcomb, J. M., Boyer, P. L., Hughes, S. H. & Arnold, E. (2001). *EMBO J.* **20**, 1449–1461.
- Sarafianos, S. G., Marchand, B., Das, K., Himmel, D. M., Parniak, M. A., Hughes, S. H. & Arnold, E. (2009). *J. Mol. Biol.* **385**, 693–713.
- Schneider, B., Cohen, D. & Berman, H. M. (1992). *Biopolymers*, **32**, 725–750.
- Schneider, B., Ginell, S. L., Jones, R., Gaffney, B. & Berman, H. M. (1992). *Biochemistry*, **31**, 9622–9628.
- Schneider, B., Morávek, Z. & Berman, H. M. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, 1666–1677.
- Schwartz, T., Behike, J., Lowenhaupt, K., Heinemann, U. & Rich, A. (2001). *Nature Struct. Biol.* **8**, 761–765.
- Serra, M. J., Baird, J. D., Dale, T., Fey, B. L., Retatagos, K., Westhof, E. (2002). *RNA*, **8**, 307–323.
- Shaw, N. N. & Arya, D. P. (2008). *Biochimie*, **90**, 1026–1039.
- Sheldrick, G. M. (2008). *Acta Cryst.* **A64**, 112–122.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O. ed. (2011). *Metal Ions in Life Sciences*, **Vol. 9; Structural and Catalytic Roles of Metal Ions in RNA**. RSC Publishing.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O. ed. (2012). *Metal Ions in Life Sciences*, **Vol. 10; Interplay between Metal ions and Nucleic acids**. Springer.
- Soto, A. M., Misra, V. & Draper, D. E. (2007). *Biochemistry*, **46**, 2973–2983.

- Stofer, E. & Lavery, R. (1994). *Biopolymers*, **34**, 337–346.
- Strobel, S. A. & Cochrane, J. C. (2007). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 636–643.
- Subirana, J. A. & Soler-Lopez, M. (2003). *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 27–45.
- Svozil, D., Kalina, J., Omelka, M. & Schneider, B. (2008). *Nucleic Acids Res.* **36**, 3690–3706.
- Tanaka, Y., Fujii, S., Hiroaki, H., Sakata, T., Tanaka, T., Uesugi, S., Tomita, K. & Kyogoku, Y. (1999). *Nucleic Acids Res.* **27**, 949–955.
- Tang, N., Muller, J. G., Burrows, C. J. & Rokita, S. E. (1999). *Biochemistry*, **38**, 16648–16654.
- Tari, L., & Secco, A. S. (1995). *Nucleic Acids Res.* **23**, 2065–2073.
- Tereshko, V., Wilds, C. J., Minasov, G., Prakash, T. P., Maier, M. A., Howard, A., Wawrzak, Z., Manoharan, M. & Egli, M. (2001). *Nucleic Acids Res.* **29**, 1208–1215.
- Thiyagarajan, S., Rajan, S. S. & Gautham, N. (2005). *Acta Cryst.* **D61**, 1125–1131.
- Thomas, T. J., Gunnia, U. B. & Thomas, T. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 6137–6141.
- Thomas, T. & Thomas, T. J. (2001). *Cell. Mol. Lif. Sci.* **58**, 244–258.
- Thomas, T. J. & Thomas, T. (1994). *Biochem. J.* **298**, 485–491.
- Tippin, D. B. & Sundaraligman, M. (1997). *J. Biol. Chem.* **267**, 1171–1185.
- Tonelli, M., Ulyanov, N. B., Billeci, T. M., Karwowski, B., Guga, P., Stec, W. J. & James, T. L. (2003). *Biophys. J.* **85**, 2525–2538.
- Vijayanathan, V., Thomas, T., Antony, T., Shirahata, A. & Thomas, T. J. (2004). *Nucleic. Acids. Res.* **32**, 127–134.
- Vijayanathan, V., Thomas T., Shirahata A. & Thomas, T. J. (2001). *Biochemistry*, **40**, 13644–13651.
- Wang, J. Y. & Casero Jr, R. A. (2006). *Polyamine Cell Signaling Physiology, Pharmacology, and Cancer Research*, pp. 91–123. Humana Press.
- Wang, Y., Deveteux, W., Stewart, T. M. & Casero Jr, R. A. (2002). *J. Biochem.* **366**, 79–86.
- Wang, A. H.-J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., van der Marel, G., van Boom, J. H. & Rich, A. (1981). *Science*, **211**, 171–176.
- Wang, G. & Vasquez, K. M. (2007). *Front. Bioscience*, **12**, 4424–4438.
- Watson, J. D. & Crick, F. H. C. (1953). *Nature*, **171**, 737–738.
- Watson, R. T., Desai, N., Wildsmith, J., Wheeler, J. F., Kane-Maguire, N. A. P. (1999). *Inorg.*



*Chem.* **38**, 2683–2687.

Watts, J. M., Dang Kristen K., Gorelick, R. J., Leonard, Ch. W., Bess Jr, J. W., Swanstrom, R., Burch, Ch. L. & Weeks, K. M. (2009). *Nature*, **460**, 711–716.

Williams L. D., Frederick C. A, Ughetto G. & Rich A. (1990). *Nucleic Acids Res.* **18**, 5533–5541.

Winn, M. D. Ballard, Ch. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A. Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson. K. S. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.

Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta Cryst.* **D67**, 235–242.

Woodson, S. A. (2005). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9**, 104–109.

Xia, T., SantaLucia, J., Burkard, M. E., Kierzek, R., Schroeder, S. J., Jiao, X., Cox, C. & Turner, D. H. (1998). *Biochemistry*, **37**, 14719–14735.

Xiong, Y. & Sundaralingam, M. (1998). *Structure*, **6**, 1493–1501.

Yi-Brunozzi, H. Y., Brinson, R. G., Brabazon, D. M., Lener, D., Le Grice, S. F. & Marino, J. P. (2008). *Chem. Biol.* **15**, 254–262.

Zakrzewska, K. & Pullman, B. (1986). *Biopolymers*, **25**, 375–392.

Zarling, D. A., Calhoun, C. J. & Zarling, A. H. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 6117–6121.

Zhang, S., Lockshin, C., Herbert, A., Winter, E. & Rich, A. (1992). *EMBO J.* **11**, 3787–3796.

Zhitkovish, A., Voitkun, V. & Costa, M. (1996). *J.Biol.Chem.* **271**, 33550–33560.